

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 844ins68 DEL GEN CISTATIONINA  $\beta$   
SINTASA (*CBS*) Y DE LOS POLIMORFISMOS A1298C Y C677T DEL GEN  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*) CON LA  
DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS**

**POR**

**LN. ANGÉLICA DENISS ESCAMILLA MÉNDEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**NOVIEMBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**  
**SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO**



**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO 844ins68 DEL GEN CISTATIONINA  $\beta$   
SINTASA (*CBS*) Y DE LOS POLIMORFISMOS A1298C Y C677T DEL GEN  
METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (*MTHFR*) CON LA  
DENSIDAD MINERAL ÓSEA EN MUJERES POSTMENOPÁUSICAS**

**POR**

**LN ANGÉLICA DENISS ESCAMILLA MÉNDEZ**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**NOVIEMBRE, 2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia y de manera muy especial quisiera agradecer a Dios, por las bendiciones y fortaleza que me brindó para lograr culminar con mis estudios profesionales.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y CONACyT por recibir el apoyo de manutención durante la maestría. Al personal administrativo y académico de la Facultad de Salud Pública y Nutrición por su apoyo y facilidades otorgadas.

Agradezco a mi director de tesis, el Dr. Zacarías Jiménez Salas, por su orientación, dirección científica, paciencia y tiempo. Gracias al Dr. Rafael Velázquez Cruz, co-director de tesis, por su apoyo, conocimientos brindados y asesoría durante la elaboración de la tesis.

Al Dr. Erik Ramírez López, por su disposición para llevar a cabo la parte experimental de la investigación en el Laboratorio de Composición Corporal, así mismo a las pasantes y becarias que me brindaron su apoyo para la evaluación clínica de mis pacientes.

A los tesistas, becarios y personal del servicio social del laboratorio de Genética y Biología Molecular, por sus conocimientos, momentos de alegría y amistad.

Al personal docente por su instrucción y dedicación, a mis compañeros por su trabajo en equipo y colaboración.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, mis padres Jesús Héctor y Angélica, porque me han brindado su cariño y apoyo incondicional, por esforzarse para que lograra culminar mis estudios; gracias mamá porque tus consejos y forma de ser me han llevado a lograr las metas que me propongo.

A mi hermano Héctor, por formar una parte muy importante de mi vida, por ser mi amigo, en quien puedo confiar y contar en todo momento.

A mi abuelita por siempre estar al pendiente de mí, por su cariño y apoyo.

A mi novio Hernán, por estar en todo momento, no dejar que desistiera en lo que me proponía, por creer en mí y mis capacidades.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Definición del problema .....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 Tejido óseo .....	6
3.1.1 Células óseas.....	8
3.1.2 El remodelado óseo .....	11
3.2 Densidad mineral ósea y osteoporosis .....	13
3.2.1 Tipos de osteoporosis .....	14
3.2.2 Epidemiología de la osteoporosis .....	15
3.2.3 Etiología y factores de riesgo relacionados con la osteoporosis .....	17
3.2.4 Diagnóstico de osteoporosis .....	19
3.3 Postmenopausia en relación con la densidad mineral ósea.....	19
3.3.1 Las vitaminas del complejo B como cofactores dietéticos que intervienen en la densidad mineral ósea.....	21
3.5 Metabolismo de la homocisteína relacionado con la densidad mineral ósea.....	22
3.5.1 Estudios relacionados con hiperhomocisteinemia y densidad mineral ósea.....	23
3.5.2 Homocisteína y fracturas .....	26
3.5.3 Otras causas de hiperhomocisteinemia.....	27
3.6 Genética de la osteoporosis .....	27
3.6.1 Polimorfismos y su análisis .....	29
3.6.2 Genética del metabolismo de la homocisteína relacionada con la densidad mineral ósea .....	31
4. JUSTIFICACIÓN .....	35
5. HIPÓTESIS.....	37
6. OBJETIVOS.....	38
6.1 Objetivo General .....	38
6.2 Específicos .....	38
7. METODOLOGÍA .....	39
7.1 Materiales.....	39

<b>7.2 Métodos .....</b>	<b>39</b>
7.2.1 Diseño del estudio.....	39
7.2.2 Estrategia general.....	41
7.2.3 Obtención de la información .....	41
7.2.4 Medición de la densidad mineral ósea.....	42
7.2.5 Determinaciones genéticas.....	43
7.2.6 Genotipificación de los polimorfismos en genes candidatos .....	46
7.2.7 Análisis estadístico.....	57
 8. RESULTADOS .....	 58
 9. DISCUSIÓN .....	 65
 10. CONCLUSIONES.....	 85
 11. REFERENCIAS.....	 87
 12. ANEXOS.....	 105

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Reactivos utilizados.....	39
II. Polimorfismos analizados en este estudio.....	46
III. Condiciones del programa de PCR .....	47
IV. Sondas TaqMan® para los SNPs del gen <i>MTHFR</i> .....	50
V. Material y equipo requerido para la preparación de las muestras de DNA para PCR-TR... 53	
VI. Cálculo de las cantidades de los reactivos del mix de la reacción.....	55
VII. Condiciones de amplificación en el equipo PCR-TR.....	56
VIII. Características generales de la población estudiada.....	58
IX. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 844ins68 del gen <i>CBS</i> y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen <i>MTHFR</i> en mujeres mexicanas postmenopáusicas .....	60
X. Asociación del polimorfismo 844ins68 del gen <i>CBS</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.....	62
XI. Asociación del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.....	63
XII. Asociación del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i> con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.....	64
XIII. Densidad mineral ósea en diferentes poblaciones.....	67
XIV. Frecuencias (%) del polimorfismo 844ins68 del gen <i>CBS</i> en diferentes poblaciones.....	70
XV. Frecuencias (%) del polimorfismo A1298C del gen <i>MTHFR</i> en diferentes poblaciones.....	72
XVI. Frecuencias (%) del polimorfismo C677T del gen <i>MTHFR</i> en diferentes poblaciones.....	76
XVII. Estudios de asociación de los polimorfismos A1298C y C677T del gen <i>MTHFR</i> con la presencia de fracturas.....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía del hueso.....	7
2. Células ósea y su desarrollo.....	10
3. Participantes celulares en la formación del hueso y resorción ósea.....	13
4. Proyección de la población en México de 2009 al 2015.....	16
5. Osteoporosis, osteopenia y densidad mineral ósea normal en México, de acuerdo al estudio LAVOS.....	16
6. Indicadores sociodemográficos de México (1930-2000).....	17
7. Metabolismo de la homocisteína.....	23
8. Localización del gen <i>MTHFR</i> .....	32
9. Localización del gen <i>CBS</i> .....	33
10. Estrategia general de la investigación.....	41
11. Representación de la técnica PCR-tiempo real.....	51
12. Metodología para la obtención de los genotipos de los SNP's mediante la técnica PCR- TR.....	54
13. Representación de las placas de 96 pocillos empleadas en PCR-TR.....	56
14. Distribución de los SNPs C677T y A1298C de acuerdo a la región geográfica y grupos mestizo (MEZ) y mexicano amerindio (MA) del país.....	78



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Nomenclatura</b>	<b>Significado</b>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
B-APN	B-aminopropionitrilo
BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferasa
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CBS	Cistationina B sintasa
CINSP	Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública
CSF-1/M-CSF	Factor 1 estimulante de colonias de macrófagos
DEXA	Absorciometría dual de rayos X
DNA/ADN	Ácido desoxirribonucleótido
DMG	Dimetilglicina
DMO	Densidad mineral ósea
DNTP's	Dinucleótidos trifosfato
ER	Receptores de estrógenos
ER- $\alpha$	Receptor de estrógenos alpha
ER- $\beta$	Receptor de estrógenos beta
FaSPyN	Facultad de Salud Pública y Nutrición
FRET	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
GWAS	Estudios de asociación del genoma completo
Hcy	Homocisteína
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IGF-B	Factor de crecimiento transformante B
IL	Interleucina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
LAVOS	Estudio de Osteoporosis Vertebral de Latinoamérica
LOX	Lisil oxidasa
LRP5	Proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad

MAF	Alelo de menor frecuencia
MCP-1	Proteína quimio-atrayente de monocitos 1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MEF2C	El factor potenciador específico de miocito 2C
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NHLBI	Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre
NHANES III	Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición III
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPG	Osteoprotegerina
PB	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PLP	Piridoxal fosfato
PMO	Pico de masa ósea
PTH	Hormona paratiroidea
RANK	Activador de NF- $\kappa$ B
RANKL	Ligando activador de NF- $\kappa$ B
RBC	Células rojas
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SPSS	Paquete estadístico para las ciencias
THcy	Homocisteína total en plasma
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
VNTR	Secuencias variables de repetición en tándem

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La osteoporosis es una enfermedad que se caracteriza por una densidad mineral ósea (DMO) reducida y un mayor riesgo a fracturas. Mundialmente la fracturas de cadera han sido proyectadas a incrementarse de 1.2 millones en 1990 a 2.6 millones para el 2025 y 4.5 millones para el 2050, sin haber cambios drásticos de la incidencia de edad y sexo. En México se estima que 1 de cada 12 mujeres y 1 de cada 20 hombres tienen fractura de cadera después de los 50 años. Así mismo se ha reportado que las mujeres  $\geq 50$  años presentan osteoporosis (OP) en columna lumbar (17%) y en cuello femoral (16%). Estudios en gemelos han evidenciado que los factores genéticos pueden explicar aproximadamente el 70% de la variabilidad de la DMO. Existe un fuerte componente genético que participa en la OP con alta prevalencia en mujeres postmenopáusicas. Entre los polimorfismos involucrados está el C677T que codifica para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y 844ins68 que codifica para la enzima Cistationina  $\beta$  sintasa (CBS). **Objetivo:** Analizar la asociación de los polimorfismos 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) y A1298C, C677T del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) y con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

**Métodos:** Es un estudio transversal, en el que participaron 232 mujeres postmenopáusicas con un promedio de edad de 45-78 años, residentes de Monterrey y el área metropolitana. Mediante previo consentimiento informado se les realizó extracción sangre en tubos con el anticoagulante EDTA para la posterior extracción de DNA y genotipificación de las variantes mediante la PCR en tiempo real con sondas TaqMan para los polimorfismos A1298C y C677T y PCR convencional para el polimorfismo 844ins68. La distribución de los genotipos se comparó con la esperada de acuerdo con el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) obteniendo una  $P \geq 0.001$ . Las mediciones de la DMO en cuerpo total (DMO\_CT), fémur derecho (DMO\_FD), fémur izquierdo (DMO\_FI), cuello femoral (DMO\_CF), dual de fémur (DMO\_DF) lumbares L2-L4 (DMO\_L2-L4),

triángulo de Wards (DMO\_TW), en trocánter (DMO\_T), se realizaron mediante el equipo DEXA (densitometría dual de rayos X). Se utilizó el estadístico de regresión lineal simple en los tres modelos de herencia (aditivo, dominante y recesivo), con el programa SPSS versión 22. **Resultados:** las mujeres postmenopáusicas con una edad promedio de  $57.07 \pm 6.91$  años, DMO\_CT=  $1.087 \pm 0.094$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_FD=  $0.919 \pm 0.135$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_FI=  $0.911 \pm 0.133$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_CF=  $0.892 \pm 0.122$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_DF=  $0.951 \pm 0.148$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_L2-L4=  $1.041 \pm 0.164$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_TW=  $0.728 \pm 0.144$  g/cm<sup>2</sup>, DMO\_T=  $0.766 \pm 0.116$  g/cm<sup>2</sup>. No se encontró diferencia significativa entre las regiones de DMO analizadas con los genotipos de dichos polimorfismos. En el caso del polimorfismo C677T se encontró en la DMO\_L2-L4 ajustada para IMC y edad cierta tendencia a una DMO menor ( $p = 0.070$ ). **Discusión y conclusión:** Los polimorfismos antes mencionados se han asociado con hiperhomocisteinemia y ésta a su vez con fracturas osteoporóticas. Debido a que la hiperhomocisteinemia afecta la producción de colágeno y no la matriz inorgánica, puede haber riesgo a fracturas por osteoporosis con niveles normal de DMO.

## 2. INTRODUCCIÓN

La OP significa hueso poroso, es una enfermedad del esqueleto que se caracteriza por una DMO y por lo tanto un deterioro progresivo de la calidad del hueso que conlleva a fragilidad y un riesgo mayor a fracturas (International Osteoporosis Foundation, 2015; Urano & Inoue, 2014).

A nivel mundial 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres está en riesgo de adquirir fracturas osteoporóticas. La mayoría de las fracturas por OP ocurren en cadera, espina lumbar (columna vertebral) y muñeca. El riesgo a fracturas en cadera y espina lumbar incrementa con la edad (IOF, 2015). En México de acuerdo a Clark, Carlos & Vázquez (2010) la población mexicana en el 2009 para el grupo de edad de 50 años fue de 19 millones, y se supone alcanzará 28 millones para el 2020 y 55 millones para el 2050.

Específicamente el grupo de mujeres postmenopáusicas por su edad que regularmente es mayor a 50 años y su estado fisiológico que conlleva cambios hormonales como la pérdida de estrógenos, se relaciona con un incremento de riesgo a adquirir fracturas por OP (Danckworth, Karabul, Posa, & Hanish, 2014; Meertens, et. al. 2011; Zhang, Tao, & Wu, 2014).

La OP está influenciada por factores genéticos y ambientales (Urano & Inoue, 2014). Los estudios genéticos han incluido investigaciones con genes candidatos y asociaciones con el genoma completo (GWAS); actualmente se han identificado una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) que se relacionan con la DMO, OP y fracturas osteoporóticas (Baines et. al. 2007). En todo el mundo sugieren que la heredabilidad de la DMO en general oscila entre 40-70% (Valdés Flores, Casas Ávila, Falcón Ramírez, & Ponce de León Suárez, 2012).

Investigaciones recientes postulan que la concentración elevada de la tHcy (homocisteína en plasma), es un riesgo a fracturas osteoporóticas en el adulto mayor, independientemente de la DMO (Bucciarelli, et. al. 2010).

Por lo anterior, esta investigación se enfoca en el estudio de un grupo de mujeres postmenopáusicas con la presencia de los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* así como el polimorfismo 844ins68 del gen *CBS*, que están involucrados en el metabolismo de la homocisteína (Hcy), por lo que se sugiere que su presencia se asocia con la DMO.

## 2.1 Definición del problema

La DMO es el principal factor que afecta la susceptibilidad a OP por fracturas y es por lo tanto el “gold standard” para la evaluación de riesgos a fracturas (Zhang et. al. 2014). La OP es una enfermedad caracterizada por presentar una disminución progresiva de la DMO y deterioro en la microarquitectura del hueso, condiciones que favorecen a la fragilidad del tejido. Es una enfermedad multifactorial causada por condiciones del estilo de vida, edad, y múltiples factores genéticos (Kondo, Fujino, Nagatomo, & Ishihara, 2014).

Los GWAS han identificado SNP's que se relacionan con la DMO, OP y fracturas osteoporóticas. La DMO parece ser que está controlada genéticamente en el 50-90% de los casos, de acuerdo a estudios de gemelos (Baines, et al. 2007; Urano & Inoue, 2014).

Diversos estudios han demostrado que los niveles elevados de tHcy se asocian negativamente con la DMO (Bucciarelli et al. 2010; Morris, Jacques , & Selhub, 2005; Ouzzif et al. 2012). Además, las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y B<sub>9</sub>, pertenecientes al metabolismo del aminoácido mencionado anteriormente, son necesarias como cofactores para el metabolismo de la Hcy (Suárez García , Gómez Cerezo, Ríos Blanco, Barbado Hernández, & Vázquez Rodríguez, 2001).

La Hcy puede ser metabolizada por dos vías: la vía de la remetilación y la vía de la transulfuración, en la primera participa la enzima MTHFR y en la transulfuración interviene la enzima CBS (Kondo et. al. 2014).

Por lo anterior, en esta investigación se busca determinar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* y los polimorfismos A1298C, C677T del gen *MTHFR* con la DMO en mujeres postmenopáusicas, con el fin de obtener datos de mujeres mexicanas que permitan ampliar el panorama de los factores genéticos que se relacionan con la OP.

### **3. ANTECEDENTES**

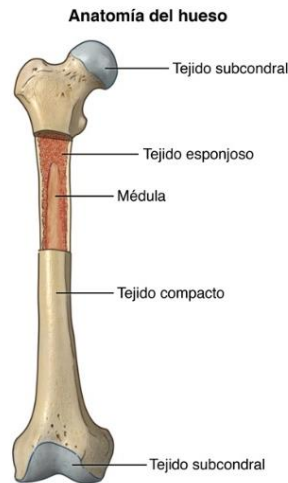
#### **3.1 Tejido óseo**

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado, constituido por células óseas, fibra y por una sustancia que llamada matriz extra celular (MEC) que le brinda las características de firmeza y dureza ideales para el sostén mecánico, mantenimiento de la postura y soporte dinámico del cuerpo (Barba, 2011). Las propiedades especiales que tiene este tejido, se deben principalmente a la composición de su matriz, en la cual se depositan las sales de calcio que se forman durante el proceso denominado calcificación o mineralización (Welsch & Deller, 2010).

Los huesos pueden ser de diferentes formas: huesos planos localizados en los parietales de la cabeza; huesos largos como parte importante de la movilidad corporal, localizados en las extremidades; huesos cortos como los que se encuentran en la muñeca y realizan movimientos limitados y huesos irregulares como los que se encuentran en las vértebras (Saladin, 2013).

Anatómicamente, el hueso, está constituido por hueso compacto o laminar situado en la parte externa, que a su vez, encierra a la cavidad medular que contiene la médula ósea. La parte central ósea, contiene un tejido más suave, denominado tejido esponjoso o trabecular. El tejido subcondral es el tejido suave que esta al final de los huesos y se encuentra cubierto de otro tipo de tejido, cartílago (Figura 1).





**Figura 1. Anatomía del hueso.** Esta imagen muestra la anatomía general del hueso humano. El tejido compacto, es tejido rígido y se localiza en la parte externa de los huesos, el tejido esponjoso, es suave y se encuentra dentro de los huesos. Fuente: Health Care, (2013).

### **Funciones del tejido óseo**

El tejido óseo, como parte importante del sistema locomotor, rodea y protege al encéfalo, también posee una función metabólica central, que involucra el almacén de calcio. De todo el calcio que hay normalmente en el organismo (1-2 kg aproximadamente, porque depende del tamaño corporal), el 99% se encuentra en los huesos. El calcio, es un ion central que participa en muchas funciones del cuerpo humano como contracción muscular, coagulación de la sangre y también funciona como almacén de minerales como magnesio, fósforo, sodio y otros iones (Welsch & Deller, 2010).

### **Componentes orgánicos del tejido óseo**

La matriz ósea está formada por 1/3 parte de materia orgánica y 2/3 partes de materia inorgánica (Saladin, 2013).

El colágeno forma la mayor parte del material orgánico del hueso, en un 90% aproximadamente, el resto de los componentes orgánicos, consisten en otras proteínas como la osteocalcina, osteopontina (fosfoproteína), osteonectina (semejante a la fibronectina), sialoproteína ósea, trombospondina, fosfatasa

alcalina, etc. La síntesis de las proteínas óseas en los osteoblastos, es estimulada por muchos factores de crecimiento, somatomedinas, en parte vitamina D<sub>3</sub>, entre otros compuestos (Rooss & Pawlina, 2007).

### **Componentes inorgánicos del tejido óseo**

Dentro de los componentes inorgánicos, se encuentra la hidroxiapatita que contribuye en mayor parte a la mineralización del hueso. El mineral inorgánico consiste en su mayor parte en una forma cristalina de depósito del fosfato de calcio que también incluye a los iones de citrato, carbonato, magnesio y sodio (Rooss & Pawlina, 2007).

La composición de material orgánico e inorgánico del tejido óseo se encuentra bajo múltiples influencias hormonales, metabólicas y alimentarias (Welsch & Deller, 2010).

#### **3.1.1 Células óseas**

Existen cuatro tipos de células óseas principales, en el mantenimiento y formación del hueso:

- Osteoprogenitoras (osteogénicas o mesenquimales pluripotenciales)
- Osteoblastos
- Osteocitos
- Osteoclastos

La activación de las células anteriormente mencionadas depende de factores sistémicos, consumo de medicamentos, estilo de vida, entre otros (Barba Evita, 2011; Saladin, 2013).

Las células osteoprogenitoras son citoblastos que se forman a partir de células mesenquimatosas embrionarias y forman los otros tipos de células óseas (Saladin, 2013).

Los osteoblastos y los osteocitos son células derivadas del mismo linaje celular, de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, también son conocidas como osteoprogenitoras, por su capacidad de proliferación y diferenciación (Barba Evia, 2011).

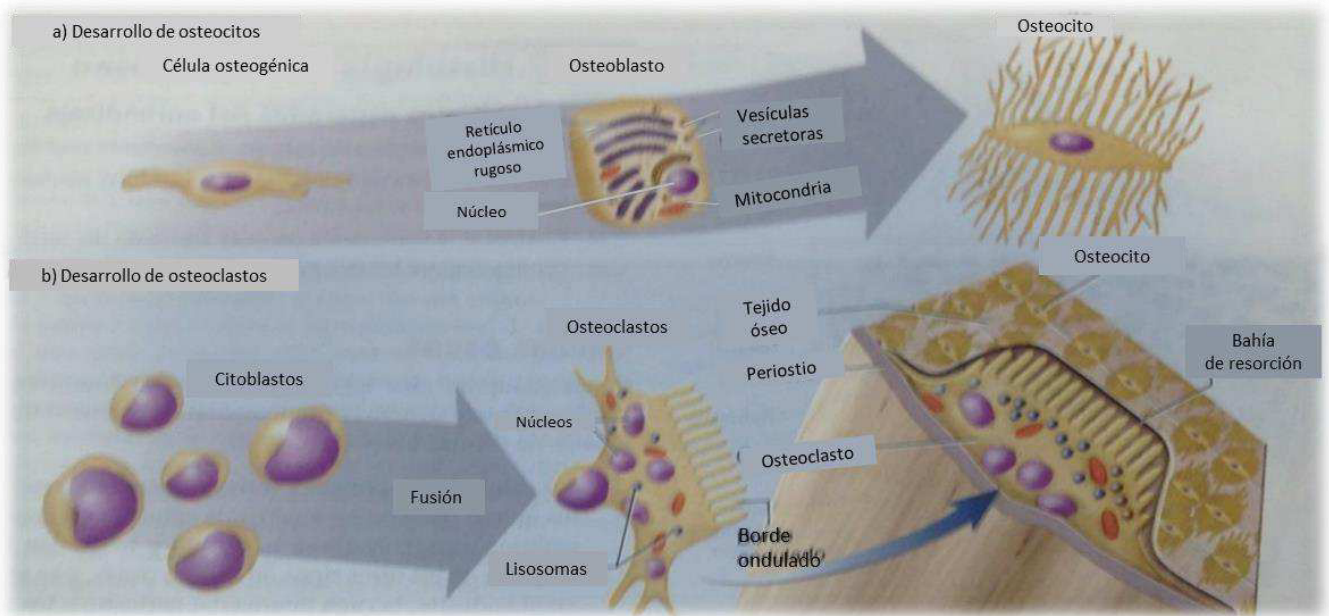
Los osteoblastos son células de tamaño grandes, de 20-30  $\mu\text{m}$  de aspecto poliédrico, su tiempo de vida está de 1 a 10 semanas y desaparecen por medio de apoptosis o se diferencian a osteocitos u otras células limitantes del revestimiento (Barba Evia, 2011). Forman la materia orgánica del hueso que luego se vuelve rígida con el depósito de minerales. Como función hormonal principal, secreta osteocalcina, una proteína estructural del hueso, que además estimula la secreción de insulina por el páncreas, aumenta la sensibilidad a insulina e interviene en el crecimiento del tejido adiposo (Saladin, 2013).

Son células que se especializan en la formación de hueso y se expresan por medio de los receptores de la hormona paratiroidea (PTH), además tienen un papel importante en el remodelado óseo, actuando como factores osteoclastogénicos, produciendo proteínas de la matriz ósea y contribuir a la mineralización del hueso (Raggatt & Partridge, 2010).

Los osteocitos representan el 90-95% de las células óseas (Raggatt & Partridge, 2010), son osteoblastos que ya cumplieron su función y se encuentran rodeados de la sustancia de la matriz ósea en cavidades llamadas lagunas conectados por conductos llamados canalículos. Estos conductos (como si fueran brazos) se ponen en contacto con otros osteocitos u osteoblastos, para llevar a cabo el paso de nutrientes, o desechos metabólicos. Forman parte del mantenimiento de la densidad mineral ósea, al llevar a cabo la absorción y depósito de la matriz ósea, secreta señales químicas para regular el remodelado óseo. Las células osteogénicas, los osteocitos y osteoblastos pertenecen a un mismo linaje celular, no así en el caso de los osteoclastos (Barba Evia, 2011; Saladin, 2013).

Los osteoclastos son células multinucleares, que cumplen la función de remover la matriz mineral ósea y se forman a partir de los mismos citoblastos que dan

lugar a los glóbulos sanguíneos. Estas células son el resultado de la fusión de varios citoblastos. La parte del osteoclasto que está en la superficie ósea tiene un borde rizado, lo que beneficia a la eficiencia de la resorción ósea. Se encuentran en las lagunas de Howship en la superficie del tejido (Saladin, 2013). Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida resistente al tartrato y el receptor de calcitonina (Figura 2).



**Figura 2. Células óseas y su desarrollo.** a) Las células osteogénicas dan lugar a los osteoblastos, que depositan matriz alrededor de sí mismos y se transforman a osteocitos. b) Los citoblastos de la médula ósea se funden para dar lugar a los osteoclastos. Fuente: Gallagher & Sai, (2010).

Los precursores de osteoclastos y osteoclastos maduros, son derivados del linaje de los monocitos/macrófagos de las células hematopoyéticas de la médula ósea (Gallagher & Sai, 2010). Dichas células necesitan la activación de dos citocinas esenciales, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o MSF-C) y el ligando activador de NF-kB (RANKL), las citocinas son producidas por células estromales (médula ósea) y osteoblastos (también las células T), respectivamente (Gallagher & Sai, 2010).

M-CSF es el principal responsable de la proliferación, supervivencia y diferenciación de los osteoclastos y el RANKL es la citocina más importante para

la activación de la diferenciación de los osteoclastos (maduren). RANKL se une a RANK localizado en la superficie del osteoclasto para que se active la formación de los osteoclastos maduros (Gallagher & Sai, 2010).

La activación de la formación de los osteoclastos mediante RANKL es inhibida por la acción de la osteoprotegerina (OPG), producida por células mesenquimales y los osteoblastos; por lo tanto la OPG es un receptor de RANKL y un regulador fisiológico negativo de la osteoclastogénesis (Gallagher & Sai, A.J., 2010; Raggatt & Partridge, 2010) (Figura 3).

### **3.1.2 El remodelado óseo**

El hueso es un tejido dinámico que se encuentra en constante adaptación para mantener el tamaño, forma e integridad estructural del esqueleto y para regular la homeostasis mineral ósea. El remodelado óseo es responsable del crecimiento y de los mecanismos necesarios para la adaptación ósea, en el que están implicados los procesos de formación y resorción ósea ocurran de manera independiente y coordinada (Raggatt & Partridge, 2010).

La resorción siempre precede a la formación y en el esqueleto joven las cantidades de hueso reabsorbidas son similares a las neoformadas. Por esto se dice que es un proceso balanceado, acoplado en condiciones normales, tanto en el espacio como en el tiempo. El tiempo promedio en que ocurre el remodelo óseo en los humanos ocurre es de 2 a 8 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea (Fernández Tresguerres, Hernández Gil, Alobera Gracia, Del Canto Pingarrón, & Jerez, 2006). El remodelado óseo se presenta durante toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. La máxima masa ósea que se pueden presentar en una persona es a los 30 años y se mantiene con pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí, existe un predominio de la reabsorción y la masa ósea empieza a disminuir (Bellido, 2014).

Este fenómeno equilibrado permite, en condiciones normales, la renovación de un 5-10% del hueso total al año (Fernández Tresguerres, et. al., 2006).

### **El remodelado óseo se puede dividir en 5 fases**

#### **1. Fase quiescente**

El hueso se encuentra en reposo, los osteoblastos se diferencian a osteocitos o mueren por apoptosis y se quedan en la superficie ósea.

#### **2. Fase de activación**

En esta fase se presentan microfracturas en las células ubicadas en la superficie ósea (osteoblastos). Por medio de señalización hormonal de PTH y estrógenos o cambios en la homeostasis del hueso, actúan las enzimas colagenasas que a su vez atraen a los precursores de osteoclastos por medio de las citocinas y hormonas.

#### **3. Fase de resorción**

La PTH produce MCP-1 (proteína quimio-atrayente de monocitos 1), los osteoclastos se incorporan a la superficie del hueso ocurre la resorción ósea, disolviendo y digiriendo la matriz osteoide. Actúan macrófagos y factores de crecimiento. Este proceso ocurre durante 3 semanas.

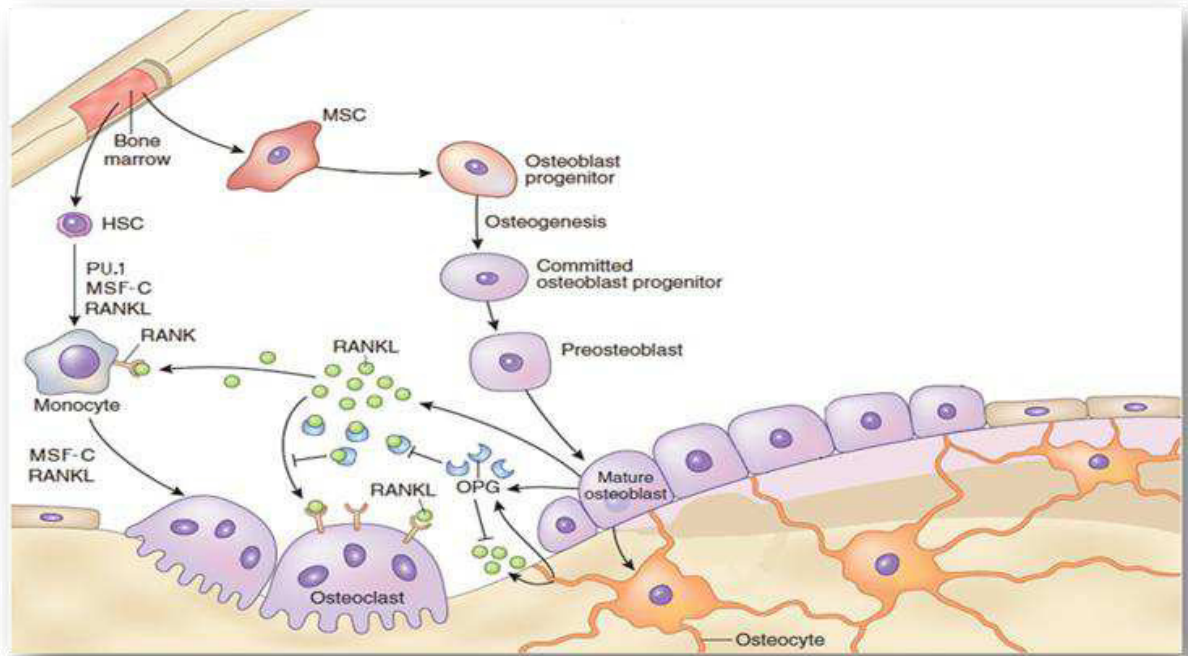
#### **4. Fase de formación**

En los sitios donde ocurrió la resorción ósea se incorporan preosteoblastos, por medio de los factores de crecimiento liberados. Los preosteoblastos se diferencian a osteoblastos y forman sustancia osteoide que cubre las zonas acribilladas por los osteoclastos. A los 11 días inicia la mineralización osteoide y dura aproximadamente de 2-3 meses.

#### **5. Fase de mineralización**

Esta fase ocurre al pasar 30 días que se llevó a cabo el depósito osteoide y el hueso cortical se forma a los 130 días y el trabecular a los 90 días. Al

terminar esta fase comienza la fase 1, como un ciclo (Barba Evia, 2011; Baron & Kneissel, 2013) (Figura 3).



**Figura 3. Participantes celulares en la formación del hueso y resorción ósea.** Fuente Baron & Kneissel (2013). Los osteoblastos y osteocitos provienen de las células madre mesenquimales (MSC), por su parte los osteoblastos se originan de las células madre hematopoyéticas (HSC).

El equilibrio de la resorción ósea está regido por factores genético, mecánicos, vasculo-nerviosos, nutricionales, hormonales, entre otros (Barba Evia, 2011).

Cuando este proceso se desequilibra aparece la patología ósea, bien por exceso (osteopetrosis) o por defecto (OP) (Fernández Tresguerres, Hernández Gil, Alobera Gracia, Del Canto Pingarrón, & Jerez, 2006).

### 3.2 Densidad mineral ósea y osteoporosis

La DMO, de acuerdo a la mencionado por el Instituto Nacional de Salud Americano (NIH por sus siglas en inglés, National Institute of Health), es el factor que principalmente afecta la susceptibilidad a osteoporosis por fracturas y el “gold

standard” para la evaluación de riesgos (Zhang, Tao, & Wu, 2014). Para medir la DMO se emplea como estándar el equipo DEXA (absorciometría dual por rayos X) (Cagnacci, Baldassari, Rivolta, Arangino, & Volpe, 2003).

El pico de masa ósea (PMO) se logra cuando una persona alcanza la máxima masa ósea, entre los 20 y 30 años de edad. El PMO depende no sólo de la edad de la persona sino también de la influencia de los factores genéticos y el estilo de vida. Después de alcanzar el PMO, ocurre una pérdida progresiva de la masa ósea, a diferente magnitud y velocidad dependiendo de los factores antes mencionados; se estima que el promedio anual de pérdida de masa ósea en las mujeres postmenopáusicas es de 1-2% y de 0.2-0.5% en los varones. Es considerado que aproximadamente el 30% de las mujeres postmenopáusicas, presenta una fase rápida de pérdida ósea (5% anual) durante los primeros cinco años después de la menopausia, lo que implica un riesgo mayor de presentar fracturas osteoporóticas (Valdés Flores et. al. 2012).

La OP es una enfermedad caracterizada por presentar una disminución progresiva de la DMO, además de un deterioro en la microarquitectura del hueso, siendo condiciones que favorecen a la fragilidad del tejido óseo, común en el envejecimiento (Klein-Nulend, van Oers, Bakker, & Bacabac, 2015). Estudios en gemelos han evidenciado factores genéticos que pueden explicar aproximadamente el 70% de la variabilidad de la DMO (Kondo et. al. 2014).

### **3.2.1 Tipos de osteoporosis**

En general existen dos tipos de OP: la primaria que es la causada por el proceso de envejecimiento, en las mujeres también se relaciona con la etapa de la menopáusica y la secundaria que se relaciona con diversas enfermedades endocrinas, renales, reumáticas, genéticas y algunos fármacos (Kondo et. al. 2014).

Una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la OP es el dolor óseo crónico; debido a que se presenta una compresión, adelgazamiento y



disminución en las medidas de las vértebras ocasionadas por microfracturas vertebrales (Kondo et. al. 2014).

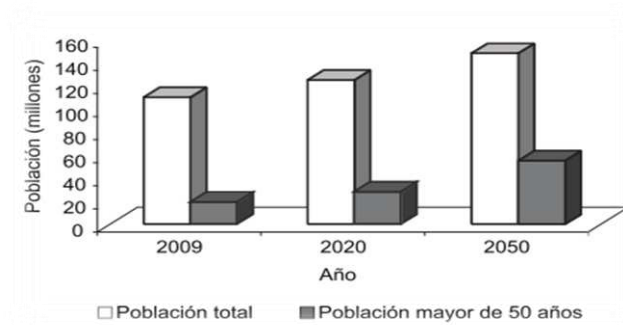
La complicación más frecuente y peligrosa de la OP son las fracturas, las cuales pueden ocurrir ante traumas muy leves e incluso de manera espontánea; es importante tomar en cuenta que a pesar de que cualquier hueso está expuesto y es susceptible de fractura, el sitio en donde éstas ocurren con mayor frecuencia es la columna vertebral (Kondo et. al. 2014).

### **3.2.2 Epidemiología de la osteoporosis**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la OP como uno de los problemas de salud pública más importante en el mundo con grandes costos laborales, familiares, sociales y, por supuesto, económicos para el sector salud. En América Latina la OP se ha convertido en una enfermedad con gran presencia (Muñoz Torres, Varsavsky & Áviles Pérez, 2010).

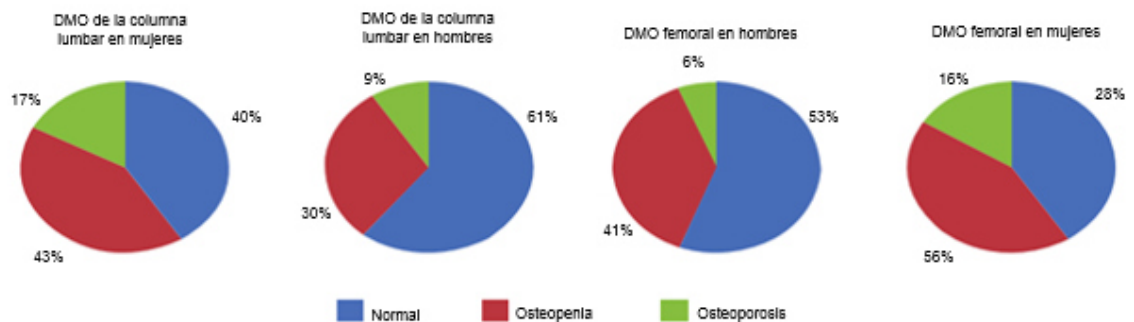
Se pronostica que, a nivel mundial, el número de fracturas en cadera se incrementa de 1.2 millones (década de 1990) a 2.6 millones para el 2025 y 4.5 millones para el 2050, asumiendo que no haya ningún cambio en la incidencia específica por edad y sexo (Clark, Tamayo, Cisneros, Rivera, & Valdés, 2013)

Un estudio realizado por Clark et. al. (2010) menciona que la población mexicana en el 2009 para el grupo de edad de 50 años fue de 19 millones, y se supone alcanzará 28 millones para el 2020 y 55 millones para el 2050 (Figura 4).



**Figura 4. Proyección de la población en México de 2009 al 2015.** Fuente: Clark, et. al. (2010).

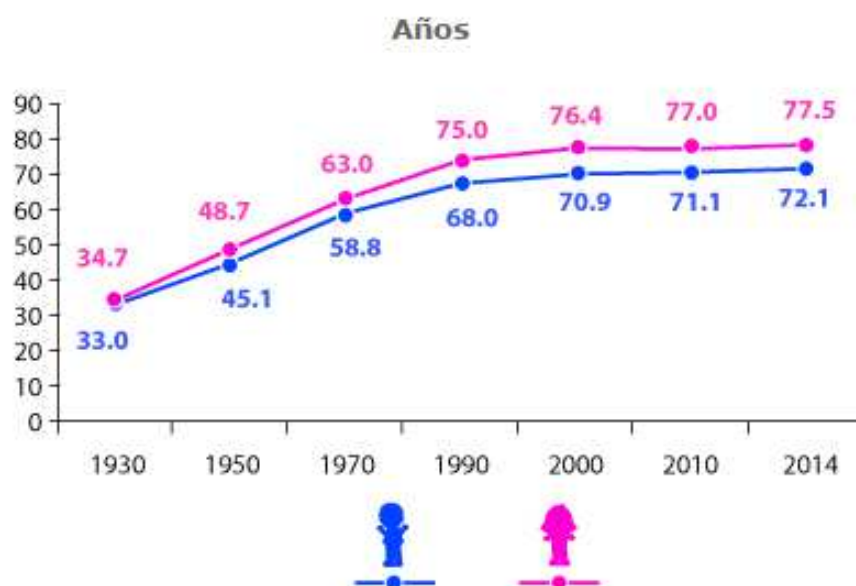
Un estudio realizado en 820 hombres y mujeres de 50 años y más, seleccionados de manera aleatoria con la DMO medida mediante el equipo DEXA evidenció que el 17% de mujeres y 9% de hombres tienen osteoporosis en la columna lumbar, además el 30% de los hombres y 43% de las mujeres presentaban osteopenia. Con la misma muestra se analizó la DMO en cuello femoral, se encontró al 16% de mujeres y 6% de hombres con osteoporosis y osteopenia en el 41% de los hombres y 56% de las mujeres (Clark et. al. 2013) (Figura 5).



**Figura 5. Osteoporosis, osteopenia y densidad mineral ósea normal en México, de acuerdo al estudio LAVOS** (por sus siglas en inglés, American Vertebral Osteoporosis Study, estudio latinoamericano de osteoporosis vertebral). Fuente: Clark, et. al., (2013).

Se estima que 1 de cada 12 mujeres y 1 de cada 20 hombres tienen fractura de cadera después de los 50 años (Clark et al. 2013).

En cuanto a la cantidad de población mayor de 50 años, es decir que se encuentra en riesgo de padecer osteoporosis, de acuerdo a lo reportado por INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en el 2014, las mujeres viven en promedio más años que los hombres, en 1930, la esperanza de vida para las personas de sexo femenino era de 35 años y para el masculino de 33. Para el 2010 este indicador fue de 77 años para mujeres y 71 para los hombres, en 2014, se ubicó en poco más de 77.5 años casi igual para las mujeres, y en 72.1 años para los hombres (Instituto Nacional de Geografía Estadística e Informática, 2014) (Figura 6).



**Figura 6. Indicadores sociodemográficos de México (1930-2000).**  
Fuente: INEGI (2014).

### 3.2.3 Etiología y factores de riesgo relacionados con la osteoporosis

Durante los últimos años, se ha creado mucha información acerca de los factores de riesgo relacionados con la OP. Podemos dividir a los factores de riesgo en dos grandes categorías: modificable, aquellos que se pueden cambiar mediante la mejora de acciones personales como el estilo de vida; y no modificables que por el contrario no se pueden cambiar; sin embargo pueden ser reducidos mediante tratamientos que coadyuven a aumentar la salud ósea (Díaz Socorro, Navarro

Despaigne, Sanatana Pérez, Domínguez Alonso , & Bacallao Gallestey, 2012; International Osteoporosis Foundation, 2007).

Dentro de la categoría de los factores de riesgo modificables están: el bajo peso, poca masa muscular, la menarquia tardía, la menopausia precoz, el sedentarismo y el ejercicio físico intenso (cuando ocasiona amenorrea), el consumo excesivo de alcohol, cafeína, tabaquismo, la ingesta reducida de calcio, las dietas hiperproteicas, dietas vegetarianas, déficit de vitamina D, los tratamientos mantenidos con glucocorticoides, con hormonas tiroideas, con fenitoína, con diuréticos que produzcan calciuria, con litio, con antiácidos con magnesio o fijadores de fosfatos, la quimioterapia, las tetraciclinas, con agonistas y antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas; enfermedades como la anorexia nerviosa, la hiperprolactinemia, la acromegalia, el hiperparatiroidismo, el hipertiroidismo, el síndrome de Cushing, la insuficiencia suprarrenal, la diabetes mellitus (con tratamiento hormonal) y el hipogonadismo (Díaz Socorro et. al. 2012).

La actividad física es un importante factor en el mantenimiento adecuado de la DMO, se han evidenciado estudios en los que se asociación de manera favorable la actividad física con el decremento de los casos de fracturas en el adulto mayor (Danckworth et. al. 2014).

Los factores no modificables incluyen edad, sexo, antecedentes familiares con repercusiones en la DMO, grupo étnico, el sexo femenino, envejecimiento (IOF, 2007).

Es indudable que la prevención, diagnóstico y control de la OP deberá es de los principales motivos de atención del médico en la práctica cotidiana, y debe ser una de sus estrategias su atención integral (Díaz Socorro et al. 2012).

### **3.2.4 Diagnóstico de osteoporosis**

El DEXA, es el equipo de elección para la medición de la DMO y diagnóstico de la OP; también es de utilidad para monitorizar la respuesta al tratamiento: además, se emplea para estudiar la composición corporal. En el estudio de la OP, la densitometría es precisa y exacta; su modalidad más habitual en la práctica clínica es la densitometría ósea axial, centrada sobre la columna lumbar y la cadera. Esta técnica permite medir la DMO y, a partir de esos datos, se puede estimar el riesgo de fractura, tomar decisiones terapéuticas, y evaluar la respuesta al tratamiento (Clarke et. al. 2014; Di Renzo et al. 2014; Lorente Ramos et. al. 2012).

La OMS define a la OP como aquella que presenta un valor de T-score por debajo de  $\leq -2.5$  SD; la osteopenia es una etapa previa de la OP que está entre los rangos de T-score entre  $-1$  y  $-2.5$  SD (Clarke et. al. 2014; Yang Huang, & Chee Kung, 2006). De esta forma, se considera que una baja DMO es un importante predictor de OP (Muñoz Torres et. al. 2010; Tolosa de Talamoni, 2007).

### **3.3 Postmenopausia en relación con la densidad mineral ósea**

La menopausia y posmenopausia son etapas fisiológicas de la vida de la mujer que se caracterizan por presentar cambios significativos a nivel orgánico, psicológico y social; estas etapas aparecen debido a las modificaciones en la función endocrina, con disminución de los niveles circulantes de estrógenos, que dan lugar a alteraciones a nivel de la composición corporal, con modificaciones en la distribución del tejido adiposo y del peso corporal (Meertens et. al. 2011). Estas condiciones son un factor que se relaciona con el incremento de riesgo a fracturas y con ello adquirir una alta morbilidad en este grupo poblacional (Danckworth et. al. 2014; Zhang et. al. 2014).

Las hormonas son uno de los moduladores más importantes de la formación del hueso (IOF, 2015). Las hormonas sexuales ejercen un beneficio en el desarrollo

y mantenimiento del esqueleto, mediante el control del crecimiento y maduración de la placa ósea tanto del hueso cortical y trabecular (Gennari et. al. 2002).

El papel del estrógeno en el tejido óseo es contribuir al mantenimiento normal de la arquitectura del hueso. Los estrógenos actúan a través de la activación del receptor de estrógenos (ER); las isoformas  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) y  $\beta$  (ER $\beta$ ) se han identificado como parte del estroma de las células osteoblásticas. Además de que los estrógenos promueven el crecimiento del hueso tienen un rol importante en la mineralización del hueso (Gennari et al. 2002; Kondo et. al. 2014).

Los estrógenos, actúan en inhibición de los osteoclastos mediante la inhibición de RANKL y el incremento de la secreción de la OPG. También contribuye a la supresión de otras citocinas intervienen en la formación de osteoclastos como las interleucinas (IL) 1, 6 y 7 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) e incrementa la formación de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) y TGF-B (factor de crecimiento transformante B) por medio de los osteoblastos (Gallagher, 2010).

En las mujeres, la deficiencia de estrógenos causada por la menopausia o remoción quirúrgica de los ovarios, causa una pérdida ósea por parte de los osteoclastos, resultando entonces un marcador importante para la disminución de la DMO (Gennari et. al. 2002). Los estrógenos son capaces de modificar la expresión de genes involucrados en el proceso de remodelado óseo, estas hormonas también pueden contribuir a una menor expresión del factor de necrosis tumoral (TNF) y reducir así la sensibilidad de los osteoclastos a la actividad de los genes *RANK* y *RANKL* (Urano & Inoue, 2014; Valdés Flores et al. 2012, Giralt et. al. 2013).

El gen *RANK*, que codifica para el activador del factor nuclear kB y el gen *RANKL*, que codifica para el activador del factor ligando nuclear kB, resultan importantes en la activación de los osteoclastos y de ciertos factores claves en la osteoclastogénesis; estos genes han sido asociados a algunas patologías: OP en la etapa de la menopausia, OP por medicamentos (glucocorticoides), artritis reumatoide, desórdenes genéticos, entre otras (Barba Evia, 2011).

### **3.3.1 Las vitaminas del complejo B como cofactores dietéticos que intervienen en la densidad mineral ósea**

Durante la edad adulta, el tipo de dieta, funge como un factor ambiental que influye en el mantenimiento de la salud en general; es importante que se considere una adecuada ingesta de vitaminas, minerales, proteínas y como parte del estilo de vida, la práctica de la actividad física. Por otra parte, como un factor no modificable, la genética que posee cada individuo, condiciona a la capacidad de formar la máxima masa ósea (Suárez García et. al. 2001).

Las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y B<sub>9</sub> son necesarias como cofactores para el metabolismo de la homocisteína ya que contribuyen a transformarla de nuevo en metionina o para transformarla en cisteína y otros compuestos que se excretan por la orina. Por tanto una dieta con una inadecuada ingestión de estas vitaminas, rica en alimentos de origen animal o altamente refinados condicionará un aumento de la tHcy (Suárez García et. al. 2001).

Bajas concentraciones en plasma de las vitaminas del complejo B se relacionan como un factor potencial para desarrollar OP, según estudios en pacientes con anemia perniciosa (por deficiencia de las vitaminas B<sub>12</sub> y B<sub>9</sub>). Eastell y otros. (1992), analizaron a 21 mujeres postmenopáusicas y encontraron que presentaban una disminución en la DMO de la espina lumbar comparado con los que no eran pacientes. En un caso reportado por Melton y Kochman (1994), un hombre de 68 años que presentaban una severa anemia perniciosa y OP, se le suplementó con vitamina B<sub>12</sub> y dramáticamente aumentó la DMO en la espina y fémur (McLean & Hannan, 2007).

Estudios en animales sugieren que la vitamina B<sub>6</sub> puede influir en el remodelamiento óseo, ya que las deficiencias en este nutriente se han relacionado con la disminución de las concentraciones de fosfatasa alcalina y osteocalcina. De acuerdo a Reynolds y otros. (1992), un estudio en humanos, revela que los pacientes con fractura de cadera tienen menores concentraciones de vitamina B<sub>6</sub>, por lo que los autores suponen que la vitamina B<sub>6</sub> puede influir

en la actividad de las proteínas que están involucradas en la regulación de la actividad de los osteoblastos. Un estudio interesante de McKusick (1966), sugiere que la Hcy influye en la formación del colágeno, sin embargo existen pocos reportes in vitro que soportan la anterior hipótesis (McLean & Hannan, 2007).

### **3.5 Metabolismo de la homocisteína relacionado con la densidad mineral ósea**

La Hcy es un aminoácido que se sintetiza en el organismo a partir de la metionina. La única fuente de metionina son proteínas, principalmente de origen animal, que se obtienen de la ingesta alimentaria. El metabolismo de la Hcy está muy relacionado con las vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y B<sub>9</sub>. La metionina que proviene de la ingesta se metaboliza, principalmente en el hígado en Hcy (Sánchez Cuevas, Jiménez Reséndiz, & Morgado Vázquez, 2009; Suárez García et. al. 2001).

Como se muestra en la figura 7, el proceso metabólico de la Hcy puede seguir dos vías: a) remetilación: en la que la Hcy se transforma de nuevo en metionina, mediante un proceso catalizado por la enzima metionina sintasa y dependiente de la vitamina B<sub>12</sub> y del N5-metilentetrahidrofolato (MTHF), forma activa del ácido fólico (B<sub>9</sub>), que actúan como cofactor y como dador de metilo también es considerado como cosustrato que es producido por la enzima MTHFR (Strakova, 2001; Suárez García et. al. 2001).

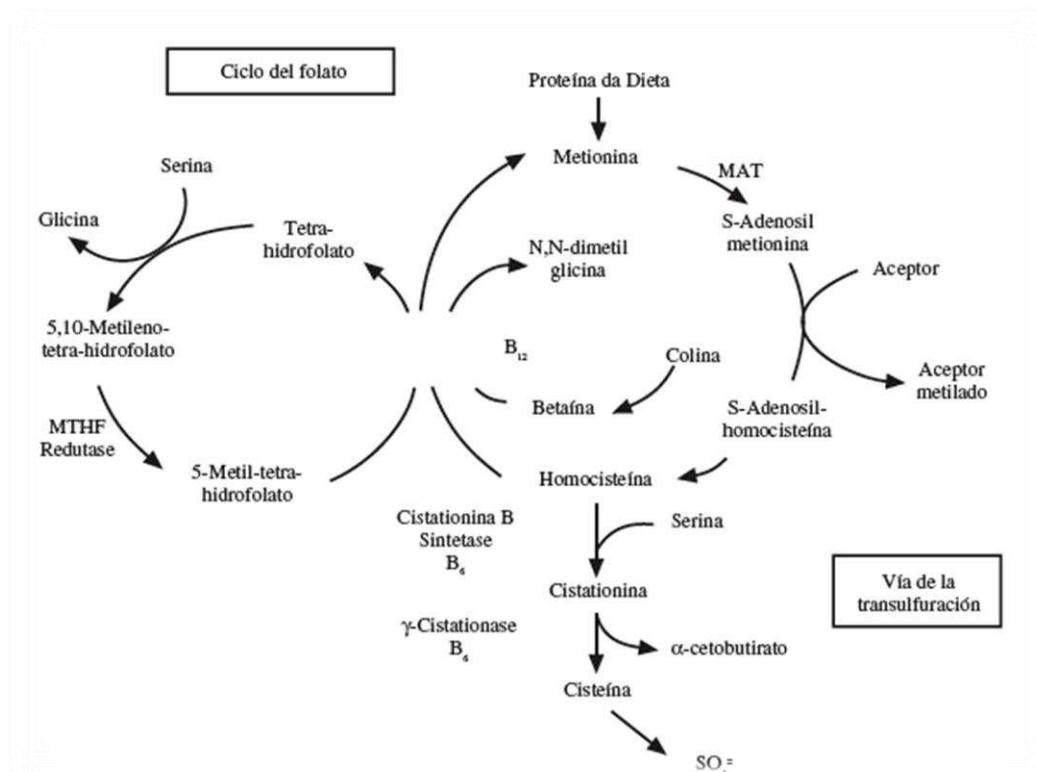
b) transulfuración: en la que la Hcy se une a la serina, se transforma en cisteína por la acción de la enzima CBS, dependiente de piridoxal-5-fosfato (PLP) una de las formas activas de la vitamina B<sub>6</sub> (Strakova, 2001; Suárez García et. al. 2001).

Una vía alternativa a las anteriormente mencionadas es la que emplea a la betaína como donador del grupo metilo y pasa de dimetilglicina (DMG) a betaina-homocisteína-metiltransferasa (BHMT) (Sánchez et. al. 2007).

Cuando la metionina está en exceso, la Hcy es directamente metabolizada por la vía de transulfuración por la CBS (Bertoia et. al. 2014; Sánchez et. al. 2007).



Las vías metabólicas que involucran el metabolismo de la Hcy son dependientes de las vitaminas del complejo B por lo que sus deficiencias pueden interrumpir éstas vías, ocasionando una elevada concentración de homocisteína. De hecho el folato, vitamina B<sub>12</sub> y vitamina B<sub>6</sub> son de los mayores determinantes de tHcy en población de adultos mayores. Los mecanismos ligados a una alta concentración de HCY y el incremento de riesgo de fracturas pudiera estar ligado a las vitaminas del complejo B (McLean & Hannan, 2007).



**Figura 7. Metabolismo de la homocisteína.** Fuente: Sánchez et. al. (2007).

### 3.5.1 Estudios relacionados con hiperhomocisteinemia y densidad mineral ósea

La concentración de Hcy en plasma depende de: factores genéticos que son los polimorfismos de la MTHFR y CBS y de factor ambientales como la edad, género, alimentación, actividad física, consumo de tabaco, entre otros (Bucciarelli et. al. 2010).

La concentración crónica de Hcy elevada puede influir en diversas enfermedades en el adulto mayor, como trombosis venosa, deterioro cognitivo, OP. La hiperhomocisteína ha sido identificada como un riesgo a fracturas osteoporóticas en el adulto mayor independientemente de la DMO (Bucciarelli et. al. 2010).

Estos recientes afirman que la hiperhomocisteinemia está asociada con un bajo nivel plasmático de vitamina B<sub>9</sub> y que está asociada con la baja DMO (Golbahar, Aminzadeh, Hamidi, & Omrani, 2005).

Un estudio realizado en 1550 personas mayores de 55 años que participaron en el tercera Encuesta de Evaluación Nacional de Nutrición y Salud de Estados Unidos de América, encontraron que las concentraciones de Hcy y la vitamina B<sub>12</sub> en plasma, están relacionadas con la DMO en adultos mayores (Morris et. al. 2005).

La tHcy y la deficiencia de vitaminas relacionado con el metabolismo de la Hcy se ha asociado con enfermedades cardiovasculares y desórdenes mentales como el Alzheimer (Gjesdal et. al. 2006).

La DMO se analizó en 2268 hombres y 3070 mujeres que participaron durante 1997-2000 en el estudio de cohorte de Hcy Hordaland, concluyendo que la tHcy y los niveles de B<sub>9</sub>, en mujeres, podría ser un potencial factor de riesgo para OP (Gjesdal et. al. 2006).

Partiendo del estudio de Hcy de Hordaland (18, 000 hombres y mujeres), asocian que el polimorfismo C677T está relacionado con el incremento de tHcy, sobre todo en las personas que tenía rangos tHcy mayores de 40 mmol/L, que en su mayoría tenían el genotipo TT con bajos niveles de vitaminas B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub> (Refsum, y otros, 2006).

La hiperhomocisteinemia está relacionada con la DMO, de acuerdo a un estudio realizado en Francia, en el que participaron hombres y mujeres con enfermedad de Crohn de edades entre 18-50 años que no tuvieran consumo de medicamentos, enfermedad o alguna situación que alterara la DMO (Roblin, Phelip, Genevoius, Ducros , & Bonaz, 2007).

Cuello femoral y espina lumbar se relacionaron de manera negativa y significativa con la hiperhomocisteinemia en 271 mujeres postmenopáusicas (Golbahar, Aminzadeh, Hamidi, & Omrani, 2005). Las mujeres postmenopáusicas tienen niveles más altos de tHcy que las pre menopáusicas (Refsum, y otros, 2006).

Un estudio realizado por Bozkurt en 2009, en un grupo de mujeres postmenopáusicas con edad promedio de 53.8 años procedentes de Turquía asoció la OP con la tHcy y vitamina B<sub>12</sub>. Los niveles más altos de tHcy fueron en las pacientes con un diagnóstico de DMO menor a -2.5 DE en columna vertebral y fémur coincidiendo con niveles bajos de vitamina B<sub>12</sub> y mediante el uso del análisis estadístico de regresión lineal, demostró que los niveles altos de tHcy y la vitamina B<sub>12</sub> son factores de riesgo independientes para OP (Bozkurt, y otros, 2009).

En un grupo de mujeres postmenopáusicas con un promedio de edad de 65 años se les realizó una evaluación de la relación de los niveles de tHcy y la DMO durante 2 años; en este trabajo se encontró que las personas con tHcy (>20μmol/L) presentaron baja DMO de fémur con una P <0.001, regresión lineal -0.103 que aquellos con bajo nivel de tHcy (<10μmol/L) y que los niveles de B<sub>12</sub> ubicados por debajo del 25 percentil se relacionaron con osteopenia/OP (Bucciarelli, y otros, 2010).

Otro estudio realizado en Estados Unidos implicó con población de adultos mayores de 68 años, en los cuales participaron 737 hombres y 813 mujeres que habían estado en periodo posmenopáusico por más de 20 años; en este trabajo

la media de DMO fue de 0.94 g/cm<sup>2</sup> y 0.77 g/cm<sup>2</sup>; se encontró que el 20% de las mujeres tenía en OP y el 42% osteopenia (Morris, Jacques , & Selhub, 2005).

Al analizar la relación entre los niveles de tHcy, las vitaminas B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> y la DMO en mujeres postmenopáusicas en Marruecos, se demostró que la tHcy era significativamente elevada en la OP (Ouzzif , y otros, 2012). Además, un estudio en ratas respecto al efecto de la Hcy con la DMO demostró una disminución relacionada con el aumento de tHcy (Soyupek, Cerci, Yildiz, Yildiz, & Gumus, 2007).

Hay otros estudios que apoyan fuertemente que la elevada concentración de tHcy es un determinante de los valores de DMO. Gerdhem y otros. (2007), analizaron 996 mujeres, todas con un promedio de edad de 75 años, encontraron que el cuartil más alto de tHcy se relaciona con un 4% menos de DMO en cuello femoral. Otra investigación realizada por Hordaland (2006), menciona que los participantes del estudio que tenían niveles altos tHcy presentaban una asociación negativa con la DMO de cuello femoral y de cadera en mujeres pero no en hombres. Morris y otros. (2005), encontraron que la DMO de cadera de 1550 hombres y mujeres alrededor de los 55 años que participaron en un estudio de NHANES III y que incluyeron participantes con OP (T-score < -2.5) tenían elevados valores de tHcy en comparación con los sujetos con DMO normal.

La Hcy parece estimular la formación y actividad de los osteoclastos (Cagnacci, Baldassari, Rivolta, Arangino, & Volpe, 2003), por lo tanto existe una posible relación entre los niveles de tHcy, la DMO y fracturas (Gjesdal C. G., y otros, 2006).

### **3.5.2 Homocisteína y fracturas**

Dos investigaciones han abierto el panorama respecto al papel de la Hcy como nuevo factor de riesgo para fracturas osteoporóticas. En el estudio de Framingham bajo la dirección del Instituto Nacional Cardíaco, Pulmonar y Sanguíneo (NHLBI por sus siglas en Inglés), se encontró que las mujeres con la

mayor concentración de tHcy ( $>13.5 \mu\text{mol/L}$ ), tienen cerca del doble de riesgo a fracturas de cadera en comparación con las mujeres que se encuentran con niveles  $<8.9 \mu\text{mol/L}$ . Los hombres que presentaron los niveles tHcy  $>15.0 \mu\text{mol/L}$  tuvieron casi el cuádruple de riesgo a fracturas de cadera en comparación las personas que presentaron valores  $<9.8 \mu\text{mol/L}$ . Dutch Van Meurs y otros (2014), encontraron una asociación similar: los hombres y mujeres de edad avanzada que estaban en el cuartil más alto de niveles de homocisteína tenían el doble de riesgo de fracturas por OP, comparados con los del cuartil más bajo (McLean & Hannan, 2007).

### **3.5.3 Otras causas de hiperhomocisteinemia**

Además de las alteraciones hereditarias, existen otras causas de aumento de la concentración de Hcy, como los son los factores dietéticos (Suárez García , Gómez Cerezo, Ríos Blanco, Barbado Hernández, & Vázquez Rodríguez, 2001).

En base a la evidencia ya descrita, se puede sugerir que los niveles de tHcy pueden ser utilizados como un predictor de fracturas o como una medida para recomendar el consumo de vitaminas del complejo B como suplementación (Chien Hsiung, Yi Chia, Feng Pan, Ming Chih, & Tsung Po , 2008; McLean & Hannan, 2007). Una dosis diaria de 0.4-0.5 mg de folato ha sido reportada como efecto reductor de Hcy en un 25% (Ramkaran, Phulukdaree, Khan, Moodley, & Chuturgoon, 2015).

## **3.6 Genética de la osteoporosis**

### **Factores genéticos**

De acuerdo con la Fundación Internacional de la Osteoporosis (International Osteoporosis Foundation [IOF], por sus siglas en inglés) (2008), la historia familiar de fracturas representa un factor de riesgo independiente de la calidad de la DMO, el antecedente familiar en primer grado de OP se ha relacionado con

disminución en el PMO. En todo el mundo sugieren que la heredabilidad de la DMO en general oscila entre 40-70% (Valdés Flores, et. al., 2012).

Los genes que se han vinculado con el control genético de la DMO se distribuyen a lo largo de todo el genoma humano y se ubican en prácticamente todos los cromosomas y cada uno de ellos cumple con funciones particulares y contribuyen de diferente manera al control genético del fenotipo óseo. Cabe mencionar que existe una relación importante entre la DMO y la masa corporal, por lo que se considera que el peso corporal es uno de los determinantes del fenotipo óseo; las mujeres con sobrepeso deberán soportar un mayor peso, por lo que su DMO suele ser mayor a las mujeres con bajo peso (incluyendo aquéllas con desórdenes alimenticios, como la anorexia) y suelen presentar una mala calidad ósea (Rumbak, y otros, 2012; Valdés Flores, Casas Ávila, Falcón Ramírez, & Ponce de León Suárez, 2012).

Ambos factores, la masa ósea y la DMO, están directamente relacionadas. Por ello, algunos genes repercuten en ambos fenotipos: óseo y masa corporal. (Valdés Flores, Casas Ávila, Falcón Ramírez, & Ponce de León Suárez, 2012); (Bruyere & Reginster, 2014)

Como se describió previamente, la OP está influenciada por factores tanto genéticos como ambientales (Urano & Inoue, Genetics of osteoporosis, 2014). Los estudios genéticos han incluido investigaciones con genes candidatos y asociaciones con el genoma completo (GWAS); actualmente se han identificado una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) que se relacionan con la DMO, OP y fracturas osteoporóticas (Baines, y otros, 2007).

Entre los genes que influyen en la OP y la DMO se encuentran los genes *COL1A1* que codifican para la colágena 1A1 (proteína estructural muy importante en el hueso), los genes *ESR1*, *ESR2* y *VDR* que codifican para los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de estrógenos y de vitamina D. En este sentido, es ya conocido que las células óseas (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos) expresan receptores de estrógenos 1 y 2, aunque con diferente distribución en el hueso cortical y

trabecular (Brincat, Gambin, Brincat, & Calleja-Agius, 2015; Valdés Flores, et. al., 2012).

Otros genes importantes en el fenotipo óseo son *IL6*, que codifica para la interleucina 6, también conocida como miocina, se trata de una citocina pro-inflamatoria relacionada con varios procesos biológicos tales como la resorción ósea, de tal manera que se ha relacionado con diversas enfermedades como la artritis reumatoide, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, cáncer, etc. En el caso de *LRP5* (proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad) se trata de un gen que codifica para la proteína LRP5, la cual participa en el desarrollo y mantenimiento de varios tejidos y representa uno de los reguladores del desarrollo y proliferación de los osteoblastos más importantes. Otros genes relevantes en el metabolismo del hueso son *RANK* y *RANK-L* que codifican para proteínas que resultan claves en el proceso de remodelado óseo. En cada uno de estos genes diversos estudios han analizado posibles asociaciones entre variantes alélicas de cada uno de ellos con pérdida de la DMO y como consecuencia con un mayor riesgo de fracturas osteoporótica (Valdés Flores, et. al., 2012).

Los genes, que de alguna otra forma se han vinculado con el control genético de la osteoporosis, se ubican en prácticamente todos los cromosomas y cada uno de ellos cumple con funciones particulares que contribuyen de diferente manera al control genético del fenotipo óseo (Valdés Flores, et. al., 2012).

### **3.6.1 Polimorfismos y su análisis**

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y por lo tanto adquieren cierta frecuencia en la población al pasar múltiples generaciones. Son la base de la evolución. Estudios epidemiológicos han propuesto que existe una variante cada 1 000 pares de bases de los 3 000 millones que se encuentran en el genoma humano (Iniesta, Guino, & Moreno, 2005)

Los polimorfismos más comunes son los de sustitución de un solo nucleótido, se les conoce como SNP (por sus siglas en inglés, single nucleotide polymorphism, polimorfismo de un cambio de un sólo nucleótido) (Inieta, Guino, & Moreno, 2005). Los SNP's aparte de ser sustituciones; pueden presentarse como repeticiones de una secuencia corta conocidos como VNTR (por sus siglas en inglés variable number tandem repeat, secuencias variables de repetición en tandem), deleciones o inserciones de un solo nucleótido (Aranguren-Méndez, Román Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2004).

Los polimorfismos ocurren en posiciones concretas del genoma humano, denominadas locus. Las variantes que pueden tener un polimorfismo dependen de los alelos. Cuando los polimorfismos son SNP hay dos alelos que se pueden presentar en el locus; por ejemplo un cambio de A (adenina) por G (guanina) representado como A > G. La pareja de alelos que un individuo posee se le conoce como genotipo, las posibles combinaciones de acuerdo al ejemplo anterior son: AA, AG, GG. Las personas que presenten los genotipos AA o GG se les denominan homocigotos y los individuos con diferentes alelos (AG) se les llama heterocigotos. Generalmente la variante del alelo menos frecuente (MAF) (que en este ejemplo es G) es la más escasa, sin embargo se necesita verificar dependiendo la población de estudio (Inieta, Guino, & Moreno, 2005).

Debido a que son sólo dos alelos, la máxima heterocigosidad que se puede presentar para cada SNP es del 50%. La mayoría de los SNP's se localizan en regiones no codificantes, por el contrario los que se encuentran en sitios codificantes, han sido relacionados con la presencia de enfermedades o modificación en la expresión fenotípica, si además el cambio ocurre en una región promotora de un gen puede modular el proceso de transcripción de ADN en ARN. Cabe mencionar que si la modificación ocurre en un intrón aunque no se traduzcan a proteína puede llevar a cambios en la estructura que a su vez modulen la expresión de un gen. Sin embargo la mayoría de las ocasiones los cambios son silenciosos sin repercusiones funcionales (Aranguren-Méndez, Román Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2004; Inieta, Guino, & Moreno, 2005).

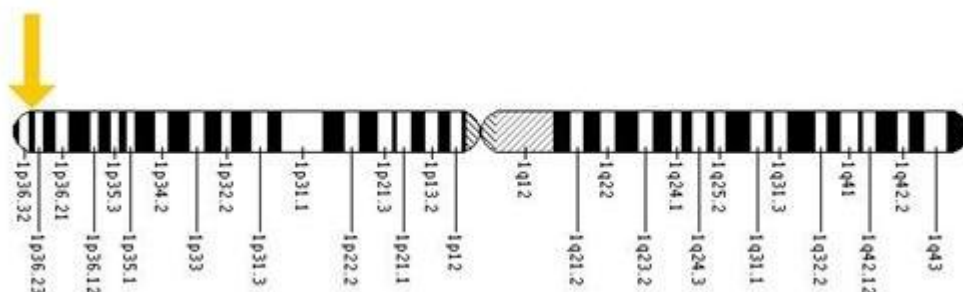


En genética, desde el punto de vista de la mejora y conservación, el principal objetivo que se persigue es estudiar, determinar y medir la variación genética (polimorfismo) existente, entre y dentro de los individuos de una población. Esta variación, se pueden medir mediante el análisis del ADN por diferentes técnicas disponibles (Aranguren-Méndez, Román Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2004).

El desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) fue descrita por Mullis y otros. (1986), es una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa, que permite la amplificación o reproducción *in vitro* de grandes cantidades de una región particular del ADN, a partir de una pequeña cantidad original de ADN molde. Para que esta enzima lleve a cabo la amplificación requiere de primers (iniciadores, promotores, oligos), cuyas secuencias son complementarias a la de las regiones flanqueantes 5' y 3' del segmento particular de ADN que se requiere amplificar (Aranguren-Méndez, Román Bravo, Isea, Villasmil, & Jordana, 2004).

### **3.6.2 Genética del metabolismo de la homocisteína relacionada con la densidad mineral ósea**

El gen que codifica para la enzima MTHFR tiene una longitud de 2.2 kb y está localizado en el brazo corto del cromosoma 1 en la posición 1p36.3, codifica para una proteína de 77 K Da. El polimorfismo C677T del gen que codifica para la enzima MTHFR, se caracteriza por una mutación puntual en posición 677 del exón 4 del gen, y consiste en el cambio de nucleótido de cisteína a timina y la transición de un residuo del aminoácido cisteína por dentro de la enzima (Liew & Gupta, 2015) (Ramkaran, et. al., 2015) (Figura 8).

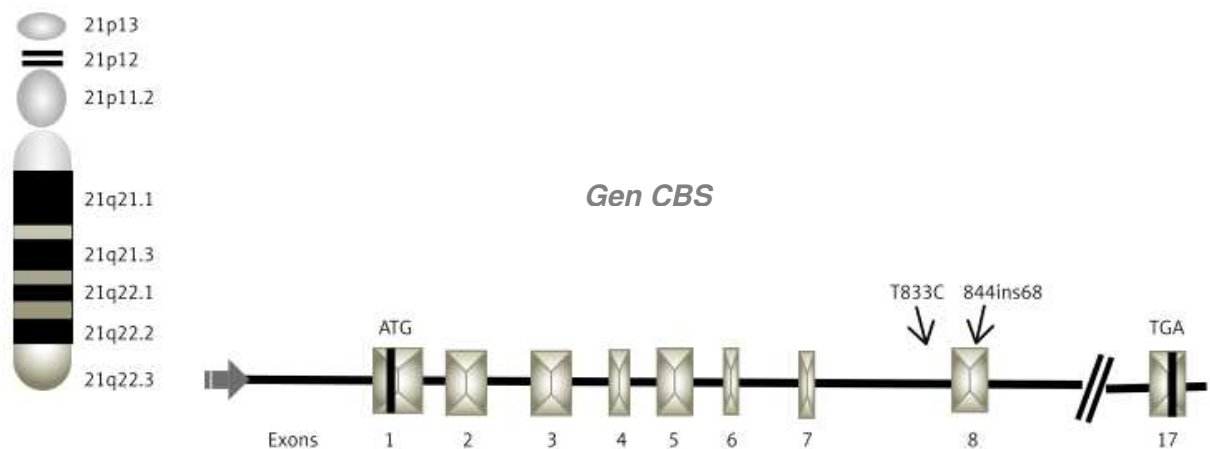


**Figura 8. Localización del gen MTHFR.** El gen MTHFR se localiza en el cromosoma 1, en la posición 36.3

La enzima MTHFR mutada es termolábil y su actividad disminuye a 37°C o más. La actividad de la enzima disminuye de 50-60%. La imposibilidad de catalizar efectivamente la conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato permite que los niveles de tHcy se eleven. El genotipo 677TT ha sido asociado con un incremento en los niveles de tHcy (Liew & Gupta, 2015; Ramkaran, et. al., 2015).

Según estudios de variantes étnicas y regionales para frecuencias alélicas, el alelo T, que generalmente es el MAF (alelo de menor frecuencia), se presenta en altas frecuencias en la población italiana (43.8%), en hispanos de California (41.7%) y en mexicanos (58.6%); cuyas poblaciones muestran alta homocigocidad para el alelo T (Nitsche, Alliende R, Santos M, Hertrampf, & Cortes, 2003).

El gen que codifica para la enzima CBS está localizado en el cromosoma 21q22.3 y codifica para una proteína de 63 kDa con 551 aminoácidos. Esta proteína es una enzima central en la vía de transulfuración en el metabolismo de la HCY para transformarse en cistationina. Los polimorfismos de la CBS son 844ins68, T833C y G919A. El polimorfismo 844ins68 del gen CBS constituye una duplicación de 68 pares de bases (pb) en el exón 8 y se ha relacionado mayormente con el incremento de la tHcy (Shengrong Ouyang, Zhuo, Yuanyuan , & Feifei, 2014) (Figura 9).



**Figura 9. Localización del gen CBS.** El gen CBS se localiza en el brazo largo del cromosoma 21, posición 22.3. El polimorfismo 844ins68 se localiza en el gen de la CBS, en el exón 8. Fuente: Gallegos-Arreola et. al. (2013).

En un estudio realizado en Brasil con 220 niños se demostró una asociación significativa entre los niveles tHcy y el polimorfismo 844ins68 y el C667T del gen *CBS* y *MTHFR*, respectivamente (Alessio, Siqueira, Bydlowski, Hoehr, & Annichino-Bizzachi, 2008).

Las deficiencias de vitaminas del complejo B tales como el B<sub>9</sub>, vitamina B<sub>6</sub> y vitamina B<sub>12</sub> y los defectos genéticos, están asociadas con las concentraciones elevadas tHcy. Sin embargo, no hay evidencia consistente que demuestre que el PLP en plasma, la forma biológica activa de la vitamina B<sub>6</sub>, y/o la mutación *CBS* (844ins68) presente una relación directa con la tHcy. De hecho el PLP en plasma se asocia con la carga post-metionina (Danckworth, Karabul, Posa, & Hanisch, 2014; Sánchez, y otros, 2007).

Los polimorfismos de los genes *MTHFR* y *CBS* están involucrados en el metabolismo de la Hcy y suelen presentarse en la hipermocisteinemia; de hecho, se ha reportado que el polimorfismo C677T es el responsable de causar el 50% de los casos de homocisteinemia en personas homocigotas para el alelo T (Alessio, Siqueira, Bydlowski, Hoehr, & Annichino-Bizzachi, 2008; Shengrong Ouyang, Zhuo, Yuanyuan, & Feifei, 2014).

El polimorfismo C677T tiene una distribución heterogénea mundial, con altas frecuencias en México. La mutación trae como consecuencia la formación de una enzima termolábil con una reducción del 70% de su eficiencia e incremento de Hcy. La doble heterogocidad 677CT/1298AC se ha encontrado asociada con la hiperhomocisteinemia especialmente en las personas que poseen bajos niveles de concentración de folato (Guéant-Rodriguez RM1, 2006).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país se estima que 24.5 millones de individuos están en riesgo de padecer o ya sufren de OP (Nava González, Gallegos-Cabriaes, & Bastarrachea, 2013); debido a que la OP es una enfermedad metabólica caracterizada por presentar una baja DMO, es conveniente analizar los factores de riesgo para adquirir esta condición: estilo de vida, actividad física, factores genéticos, entre otros (Clarke, et. al., 2014; Yang Huang & Chee Kung, 2006).

Se pronostica que, a nivel mundial, el número de fracturas en cadera se incrementa de 1.2 millones (década de 1990) a 2.6 millones para el 2025 y 4.5 millones para el 2050, asumiendo que no haya ningún cambio en la incidencia específica por edad y sexo (Clark, et. al., 2013).

En la actualidad, en México el 17% de mujeres y 9% de hombres de 50 años y más tienen osteoporosis en la columna lumbar, 16% de mujeres y 6% de hombres tienen osteoporosis en la cadera, de acuerdo al estudio LAVOS (Clark, et. al., 2010).

La OP por fracturas se relaciona con una baja DMO que se relaciona negativamente con la Hcy (Bucciarelli et al., 2010; Morris, Jacques, & Selhub, 2005). Los niveles elevados de homocisteína en plasma están asociados negativamente con la DMO (Bucciarelli, y otros, 2010). Además que la tHcy también puede incrementarse con la presencia de los polimorfismos de genes que codifican para enzimas del metabolismo de la Hcy. Diversos estudios han demostrado que los polimorfismos 844ins68 del gen *CBS* y A1298C, C677T del gen *MTHFR* están asociados con el incremento de la tHcy (Alessio, et. al., 2008). Dicha asociación se puede atribuir a las vitaminas del complejo B: vitamina B<sub>9</sub>, vitamina B<sub>12</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, como contenido bajo de estos nutrientes y así asociarse con la calidad del hueso (McLean & Hannan, 2007).

Por lo anterior, es de suma importancia contar con datos que permitan conocer la influencia que tienen los polimorfismos A1298C, C677T del gen *MTHFR* y 844ins68 del gen *CBS* con la DMO en mujeres mexicanas postmenopáusicas. El proyecto resulta viable pues se cuentan con las instalaciones del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (Laboratorio de Composición Corporal, Laboratorio de genética y Biología Molecular) así como con la colaboración con el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) (Consorcio de Enfermedades Cardiovasculares y Óseas) que permiten llevar a cabo el proceso de análisis genético. Estos nuevos datos permitirán ampliar el mapa genético de la osteoporosis y coadyuvar con una oportuna prevención del desarrollo de la enfermedad antes mencionada.

## 5. HIPÓTESIS

Existe asociación del polimorfismo 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Analizar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen (*MTHFR*) y con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

### 6.2 Específicos

- Determinar la densidad mineral ósea mediante la absorciometría dual de rayos X en cuerpo total, cadera total (fémur derecho e izquierdo, cuello media, cuello superior e inferior media, diáfisis, dual de fémur, triángulo de Wards y trocánter) y columna lumbar (L2-L4) en un grupo de mujeres postmenopáusicas.
- Determinar la frecuencia alélica y genotípica del polimorfismo 844ins68 del gen que codifica para la enzima Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen que codifica para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en mujeres postmenopáusicas.
- Evaluar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen que codifica para la enzima Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen que codifica para la enzima Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) en mujeres postmenopáusicas.



## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 Materiales

Los reactivos empleados en los procedimientos utilizados para evaluar los polimorfismos se obtuvieron de diferentes marcas comerciales (Tabla I).

**Tabla I. Reactivos utilizados**

Reactivos	Marca Comercial
NaCl, Tris, SDS, EDTA	Bio-Rad
Fenol, Tritón 100X	Research organics
Cloroformo	CTR Scientific
Etanol	Bio Basic Inc.
Kit para extracción de DNA genómico	QIAGEN
Alcohol isopropílico grado molecular	CTR Scientific
Sondas TaqMan® Universal Master Mix, 40X assay	Applied Biosystems

### 7.2 Métodos

#### 7.2.1 Diseño del estudio

Es un estudio transversal, descriptivo y correlacional. Las unidades de observación fueron mujeres postmenopáusicas procedentes de Monterrey Nuevo León y el área metropolitana. Se llevó a cabo un muestreo no probabilístico, intencional, por factibilidad. Las participantes fueron mujeres postmenopáusicas aparentemente saludables; se excluyó a las mujeres con patologías que pudieran alterar la DMO (artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1, hiperparatiroidismo, fibrosis quística, hipogonadismo, enfermedad hepática crónica), que realizaran actividad física vigorosa o que consumieran fármacos con efecto sobre el metabolismo óseo (calcio, vitamina D, antirresortivos, anabolizantes, hormonas

varias, etc.); se eliminaron a aquellas mujeres cuya muestra de DNA no fuera suficiente para realizar la genotipificación, tuvieran parentesco familiar con otra de las participantes o que su expediente estuviera incompleto.

El desarrollo experimental del estudio se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular y en el Laboratorio de Composición Corporal del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), así como en el Laboratorio de Genómica de las Enfermedades Cardiovasculares y Óseas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la FaSPyN de la UANL (No. de registro 15-FASPYN-SA-15), además de contar con el consentimiento informado de todas las participantes de acuerdo con Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Secretaría de Salud, 1998).

### 7.2.2 Estrategia general

Para cumplir con los objetivos que se plantearon en la investigación, se siguió la estrategia general que se presenta en la figura 10.

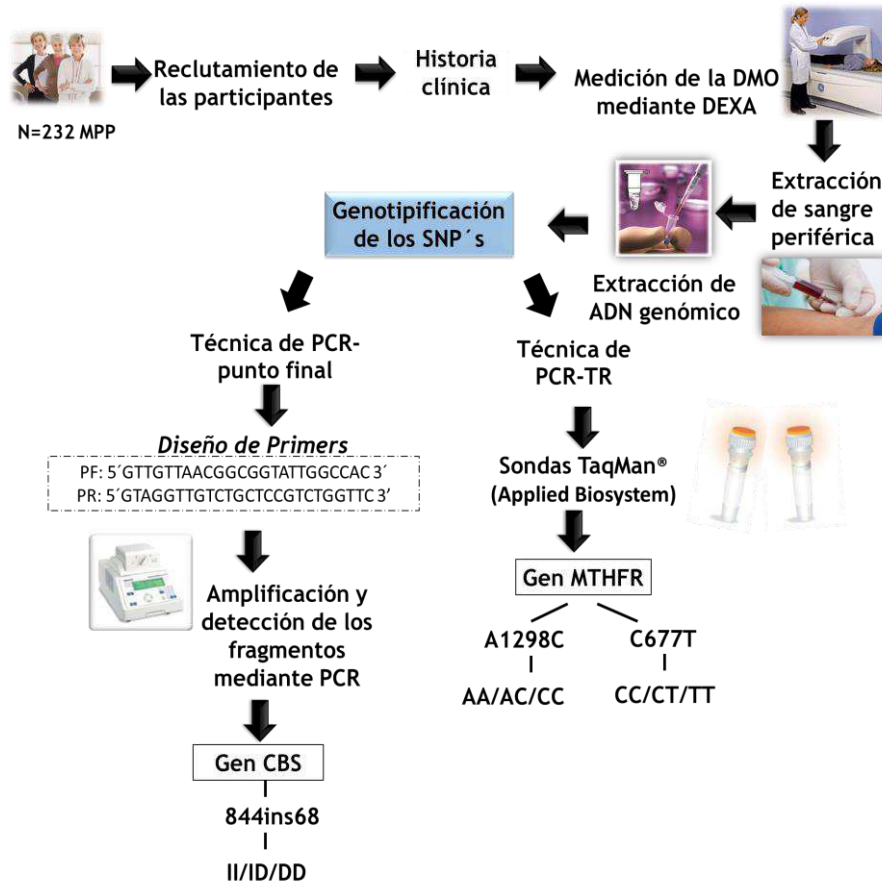


Figura 10. Estrategia general de la investigación

### 7.2.3 Obtención de la información

Mediante el empleo de volantes y posters, se invitó a participar en este estudio a mujeres mayores de 40 años, residentes de diferentes localidades del municipio de Monterrey N. L. Las participantes que cumplieron con los criterios de inclusión anteriormente estipulados firmaron una carta de consentimiento informado donde se les notificó en qué consistía su participación y los riesgos de los procedimientos a realizar para su evaluación.

La muestra se completó a partir de bases de datos realizadas en investigaciones anteriores, considerando a las mujeres que cumplieran con los criterios de inclusión y que además tuvieran datos completos (edad, peso, talla, porcentaje de grasa y mediciones de DMO en cuerpo total, columna lumbar L2-L4, cadera total que involucra: fémur derecho e izquierdo, cuello media, cuello superior e inferior media, diáfisis, dual de fémur, triángulo de Wards y trocánter).

La muestra total fue de 232 mujeres postmenopáusicas de las cuáles 175 respondieron a la convocatoria para este estudio y 57 pacientes se seleccionaron a partir de las bases de datos anteriores. Las muestras de DNA de las 58 pacientes, se obtuvieron del banco de DNA del Laboratorio de Genética y Biología molecular del CINSP de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.

#### **7.2.4 Medición de la densidad mineral ósea**

Se les determinó la DMO de tres regiones: cuerpo total, cadera total y columna lumbar L2-L4. Se empleó la técnica de absorciometría dual de rayos X (DEXA), utilizando el densitómetro Lunar PRODIGY Advance, modelo 301264. G. E. y de acuerdo a lo establecido por la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (Leib, Lewiecki, Binkley, & Hamdy, 2004); se utilizaron las posiciones oficiales de la Sociedad Internacional de Densitometría Clínica.

Las participantes se presentaron con un ayuno de al menos 2 horas (para no afectar las mediciones de la composición corporal); debieron llevar ropa que careciera de accesorios metálicos (zippers), collares o pulseras que pudieran alterar los resultados de la DMO.

#### ***Determinación de la DMO de cuerpo total (DMO\_CT)***

Se colocó a la persona en la plancha (cama del DEXA) en posición supina, viendo al frente a 3 cm de la línea superior marcada en el equipo DEXA y se procedió a realizar el escaneo.

### ***Determinación de la DMO de dual de fémur (cadera total) (DMO\_DF)***

La persona permaneció acostada en la plancha, en posición supina; las piernas ligeramente separadas, se sujetaron las piernas y tobillos con cintas ajustables empleando el aditamento del equipo (en forma triangular) que brindó soporte a los pies para la correcta posición. Las manos se colocaron a la altura del pecho en forma de cruz. Para llevar a cabo la medición, el escáner se colocó a 3 cm de la sínfisis púbica, a la mitad de la pierna, tomándose también así la medición del fémur izquierdo y derecho.

### ***Determinación de la DMO de la columna vertebral anteroposterior (DMO\_L2-L4).***

La persona se colocó en posición supina sobre la plancha del equipo, se empleó un cubo de hule espuma como apoyo para elevar las piernas del sujeto, para que así las piernas de la persona formen un ángulo de 60° a 90° con respecto a la mesa, las manos se colocaron en forma de cruz a la altura del pecho. Se colocó el escáner 2 cm por debajo del ombligo y se procedió a tomar la medición (GE Healthcare, 2010).

## **7.2.5 Determinaciones genéticas**

### ***7.2.5.1 Extracción de sangre periférica***

A las participantes se les realizó extracción de sangre periférica mediante punción venosa; se extrajeron 5 ml de sangre en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer®) para la obtención del DNA genómico. El procedimiento anterior fue realizado por personal capacitado de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

### ***7.2.5.2 Extracción del DNA genómico***

Para la extracción del DNA (ácido desoxirribonucleico) genómico de las muestras se emplearon dos técnicas. Para las primeras muestras de sangre se utilizó el método de lisis TSNT (Sambrook & Russel, 2001); posteriormente, para la

extracción de DNA genómico de las últimas 80 muestras, se utilizó el kit QIAamp DNA Blood Midi/Maxi (QIAGEN, USA).

*El método de lisis TSNT para extracción de DNA genómico se describe a continuación:* Los tubos con sangre total y EDTA fueron centrifugados a 3, 200 rpm en una centrífuga refrigerada (marca: Eppendorf, modelo 5804 R) y se extrajo el botón leucocitario que se depositó en un tubo de polipropileno de 1.5 mL, se centrifugó nuevamente a 3, 200 rpm y se volvió a extraer el botón leucocitario (aproximadamente 300 µl), posteriormente, se adicionaron 300 µl de buffer de lisis TSNT (0.06% Tritón X-100, SDS 1%, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl a pH de 8) y se mezcló por vórtex por 10 segundos (marca: genie 2, modelo G650 Daigger). Se añadieron 200 µl de fenol y 100 µl de cloroformo y se mezclaron por vórtex hasta que la muestras adquiriera un color uniforme, se agregaron 100 µl y posterior a ello se agitó en el vórtex por 10 seg. Luego se añadieron 150 µl de buffer TE 1X y aplicó vórtex 10 seg. Se centrifugó por 11 min a 13,200 rpm en una microcentrífuga (marca: Eppendorf, modelo 5415D). Se transfirió el sobrenadante a otro tubo de polipropileno y se centrifugó por 6 min a 13,200 rpm. El sobrenadante (500 µl aprox.) se transfirió a un nuevo tubo de polipropileno y se agregó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló por inversión e incubó a -20°C por lo menos 40 minutos (puede quedarse durante toda la noche). Se centrifugó por 11 min a 13,200 rpm. Se eliminó el sobrenadante por decantación, teniendo cuidado de no tocar la pastilla blanca (DNA) que se forma en la base del tubo. Se lavó el pellet de DNA agregando 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 6 min a 13,200 rpm y por último se decantó el sobrenadante; el tubo se colocó de forma invertida y se dejó secar a temperatura ambiente entre 5 y 10 min, colocando un papel absorbente en la mesa de trabajo para evitar contaminación (el exceso de etanol se puede eliminar por aspiración con puntilla para micropipeta y luego dejar secar los tubos). El DNA obtenido se suspendió en 200 µl de agua ultra pura y se almacenó a -20°C hasta su uso.

*El método de extracción de DNA genómico mediante el KIT de QIAGEN, se describe brevemente:* Se transfirieron 5 ml de sangre total (o todo lo que contiene

el tubo de marca vacutainer® con EDTA) a un tubo de polipropileno de 15 ml, se adicionaron 9 ml de la solución de lisis RBC (Red Blood Cell) a la sangre y se mezcló por inversión durante 20-30 min a temperatura ambiente, después se centrifugó a 3,000 rpm por 15 min a 8°C, se procedió a decantar el sobrenadante, se adicionó 5 ml de RBC al botón de células blancas y se mezcló aplicando vórtex e incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 3 000 rpm por 15 min. Luego se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo invertido colocando papel absorbente para que absorba el líquido que se desecha. Después de 10-15 min se añadieron 500 µl de RBC y se mezcló con vórtex, se adicionaron 3.5 ml de solución de lisis de células blancas y se mezcló de igual forma hasta que desaparecieron los restos celulares (la solución se puede dejar a temperatura ambiente durante todo el día o de 2-3 horas), posteriormente se aplicó vórtex durante 10 segundos, se adicionó 1 ml de solución de solución precipitadora de proteínas y se mezcló con vórtex por 30 segundos; la muestra se colocó en hielo o a -20°C durante 15 min. Se centrifugó, a 3,500 rpm durante 10 min, se aplicó vórtex sin romper el botón, se volvió a centrifugar a 3 500 rpm por 10 min, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de polipropileno y se desechó el anterior. Se adicionó al sobrenadante 5 ml de isopropanol y mezcló por inversión hasta que la hebra de DNA fue visible; se almacenó a -20 °C o a -70°C durante 12 horas para aumentar la precipitación del DNA. Posteriormente se centrifugó a 4 000 rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 ml de alcohol al 70%; se mezcló con vórtex para después centrifugar a 3 000 rpm por 5 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar de manera invertida a temperatura ambiente durante todo el día. Se hidrató el DNA con 500 µl de agua hidratadora libre de DNAasas.

El DNA se cuantificó en el NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) para verificar que las muestras tuvieran una relación 1.6-2.0 en la relación de absorbancias 260/280, lo que supone una pureza adecuada del DNA para los análisis posteriores.

### 7.2.6 Genotipificación de los polimorfismos en genes candidatos

Se analizaron tres polimorfismos (tabla II) que de acuerdo a la literatura se relacionaban con el metabolismo de la homocisteína ya que este aminoácido se ha asociado a su vez con la densidad mineral ósea. Para el análisis de genotipos del polimorfismo 844ins68 se empleó la técnica convencional de PCR-punto final y para los SNPs A1298C y C677T se utilizó la técnica PCR-TR en el sistema StepOne Plus PCR-RT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

**Tabla II. Polimorfismos analizados en este estudio**

Gen	Localización del gen	Posición en el gen	Polimorfismo	Cambio
<b>MTHFR</b>	C677T	Cromosoma 1 (1p36.3)	C/T	Exón 4
	A1298C		A/C	Exón 8
<b>CBS</b>	844ins68	Cromosoma 21 (12q22.3)	Inserción/Delección	Intrón 7 y exón 8

#### 7.2.6.1 Genotipificación del polimorfismo 844ins68 mediante la técnica PCR convencional

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desarrollada por Kary Mullis, es una técnica de reacción enzimática *in vitro* que, mediante varios ciclos repetidos, amplifica millones de veces una determinada secuencia blanco de DNA. La enzima que se emplea con mayor frecuencia en esta reacción se le conoce como DNA polimerasa y de la bacteria *Thermus aquaticus*, que puede resistir altas condiciones de temperatura, ya que es una enzima termoestable. La técnica de PCR permite estudiar y manipular eficazmente el DNA y con ella se han podido establecer protocolos experimentales para analizar genes, mutaciones, polimorfismos, patologías, etc. (Tamayo-de Dios & Velasquillo C, 2013).

Los elementos necesarios para realizar una PCR son el DNA molde, la enzima DNA polimerasa, los oligonucleótidos (primers, promotores, iniciadores), dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados: adenina, timina, citosina y guanina), ión Magnesio ( $Mg^{2+}$ ), buffer y  $H_2O$ . El aparato que se utiliza es un termociclador que



se caracteriza por realizar cambios bruscos de temperatura en muy corto tiempo, estos cambios son necesarios para que ocurran las reacciones necesarias en el proceso.

Para determinar el polimorfismo 844ins68 del gen de la CBS se utilizaron los primers propuestos Dutta, et. al., (2005), con algunas modificaciones. Los oligonucleótidos previamente reportados se modificaron utilizando los programas Oligocalc: Oligonucleotide Properties Calculator (Kibee, 2007) y Primer Blast de NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016).

Los oligonucleótidos resultantes fueron:

Primer Forward 5'GTTGTTAACGGCGGTATTGG**CCAC** 3'

Primer Reverse 5'**G**TAGGTTGTCTGCTCCGTCTGGTTC 3'

*\*Los nucleótidos que se añadieron se representa en negritas.*

El equipo que se empleó para analizar el polimorfismo 844ins68 del gen CBS, fue el termociclador Mastercycler personal Eppendorf. Las condiciones empleadas se muestran en la tabla III.

**Tabla III. Condiciones del programa de PCR**

<b>Pasos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (segundos)</b>	<b>Proceso</b>	<b>Ciclos</b>
<b>1</b>	95	300	Desnaturalización inicial	1
<b>2</b>	95	30	Desnaturalización	35
<b>3</b>	55	30	Alineamiento	
<b>4</b>	72	30	Extensión	
<b>5</b>	72	300	Extensión final	1

Los geles para electroforesis se prepararon de la siguiente manera: la agarosa se pesó, se depositó en un matraz, se agregaron 25 mL de buffer TAE 1X por gel y se calentó en la placa de calentamiento (Stirrer/hot plate, marca: Corning) hasta

que el líquido fue homogéneo y cristalino, se vació el contenido del matraz en un tubo de polipropileno de 50 mL y se agregó 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml); se mezcló el contenido por inversión y por último, se vació en el molde en el que se cargarían las muestras a analizar; se colocó el peine de electroforesis. Cuando la agarosa gelificó se le quitó el peine, se colocó en una cámara de electroforesis (Bio-rad, modelo minisub cell GT) y se cubrió con buffer TAE 1X para que las muestras pudieran migrar adecuadamente.

Para estimar la talla molecular del DNA analizado, se utilizó el marcador HyperLadder IV (de 100 a 1000 pb, marca Bioline); en el carril 1 del gel se colocaron 3 µl del marcador, en los carriles siguientes se agregaron 6 µl del producto amplificado y 2 µl del buffer de carga. Las condiciones de electroforesis fueron 20V por 5 minutos y 40 V por 80 minutos en la cámara de electroforesis.

Los productos de PCR amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% en buffer TAE 1X; las condiciones de la electroforesis fueron 20V durante 5 min y posterior 80V a 45 min utilizando la fuente de poder Power Pac 300 (Bio-Rad). Para visualizar el patrón de bandeo del producto amplificado se utilizó el foto-documentador Gel Doc- It Imaging System, UVP; se reconocieron los siguientes patrones: una banda de 239 pb para el genotipo II, una banda de 171 pb para el genotipo DD, y una banda de 239 pb y otra de 171 pb para el genotipo heterocigoto ID (Tamayo-de Dios & Velasquillo, 2013).

#### ***7.2.6.2 Genotipificación de los SNPs A1298C y C677T mediante la técnica de PCR en tiempo real***

El objetivo de la técnica PCR en tiempo real (PCR-TR) es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el empleo de sondas reporteras fluorescentes en la reacción. A diferencia de la PCR en punto final, en esta técnica es posible cuantificar *in situ* la cantidad de DNA que contiene la muestra.

Existen dos métodos para llevar a cabo el análisis por PCR-TR

a) No específicos: se basa en el empleo de moléculas que se intercalan al DNA de doble cadena y al oxidarse se vuelven fluorescentes; un ejemplo de estas sondas son las denominadas SYBR Green.

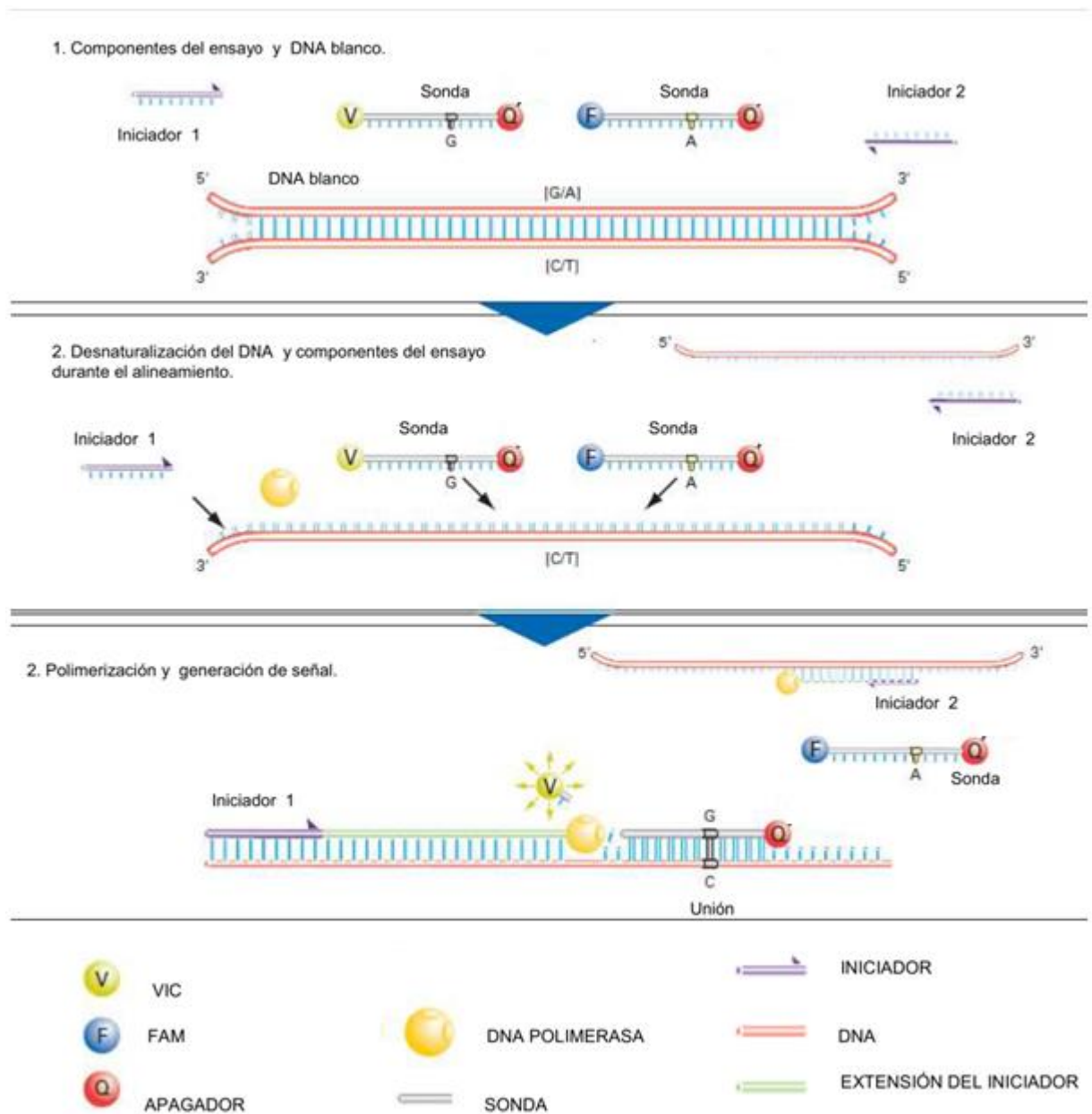
b) Específicos: al igual que el método anterior, también emiten señal de energía de resonancia fluorescente (FRET), transmitiendo la energía desde un donador a un reportero aceptor (quencher). Este método puede seguir el principio de hidrólisis o hibridación. En este caso, el método específico basado en hidrólisis emplea sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero aceptor y un reportero fluorescente, ambos reporteros se encuentran unidos hasta que la sonda hibride en la secuencia blanco, si lo anterior sucede, ocurren cambios conformacionales en el reportero fluorescente y el reportero aceptor (quencher) y la Taq polimerasa realiza su actividad como exonucleasa 5' a 3' y rompe la unión, entonces el quencher se libera y la fluorescencia es emitida por el reportero fluorescente (Tamayo-de Dios & Velasquillo, 2013) (Figura 14).

Las sondas que se emplearon en este estudio se muestran en la tabla IV. Se emplearon para realizar la genotipificación de los SNPs A1298C y C677T del gen de la MTHFR. Se emplean dos sondas para cada polimorfismo, debido a que cada una posee la variante alélica a determinar (por ejemplo en el caso del polimorfismo C677T tiene una sonda que tiene la variante alélica G y la otra la variante alélica A). Para diferenciar estas dos sondas se emplearon reporteros fluorocromos (fluoróforos) diferentes: VIC® y FAM™

**Tabla IV. Sondas TaqMan® para los SNPs del gen *MTHFR*.**

SNP	ID	Localización	Secuencia VIC/FAM
rs1801133	C_1202883_2	Chr.1: 11856378	GAAAAGCTGCGTGATGATG AAATCG[G/A]CTCCCGCAGA CACCTTCTCCTTCAA
rs1801131	C_850486_20	Chr.1: 11854476	AAGAACGAAGACTTCAAAG ACACTT[G/T]CTTCACTGGT CAGCTCCTCCCCCA

Fuente: SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays (Applied Biosystems®, 2015).



**Figura 11. Representación de la técnica PCR-tiempo real.** Existen dos sondas, cada una con el fluoróforo que puede ser VIC o FAM y el apagador o receptor llamado quencher. Cada sonda es específica para identificar los alelos a detectar (en este ejemplo para C/T). La enzima Taq DNApolimerasa realiza la actividad de exonucleasa para liberar el fluoróforo y con ello, emitir la fluorescencia, si la unión no se lleva a cabo no se detecta la fluorescencia. Adaptación de Falcón Ramírez (2009).

## **Metodología para la obtención de los genotipos de los SNPs mediante la técnica PCR-TR**

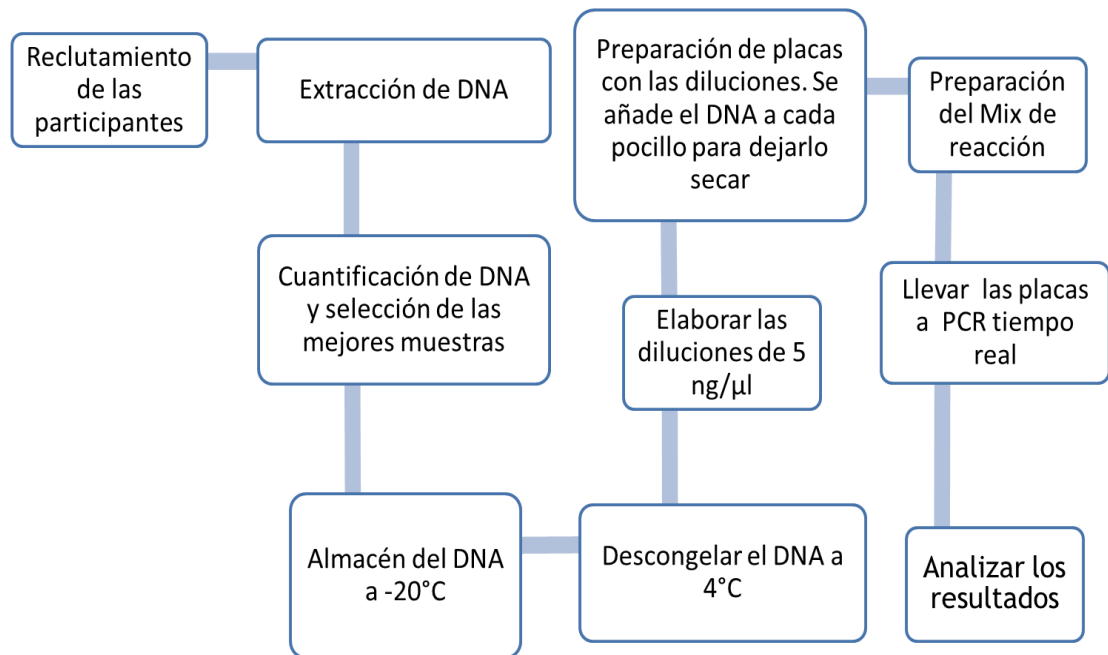
Antes de realizar la PCR-RT de acuerdo a Applied Biosystems, 2010, se siguieron los siguientes pasos:

- Se cuantificó el DNA contenido en cada muestra mediante el uso del equipo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer y se realizan diluciones de 5 ng/ $\mu$ l para un volumen final de 250  $\mu$ l (para evitar pérdidas y prevenir futuras repeticiones)
- Se elaboraron placas maestras con las diluciones de DNA de cada muestra y a partir de éstas se elaboraron las repeticiones; debido a que se midieron dos polimorfismos solo se necesitaron 2 repeticiones, sin embargo se consideraron más en caso que se tuviera que repetir el experimento.
- Cada placa tuvo 6 pocillos sin llenar, que fungieron como controles.
- Para las repeticiones se utilizó una pipeta multicanal con llenado de 5  $\mu$ L para cada pocillo y una vez terminado el proceso se cubrió cada placa con un paño libre de pelusa (Kimwipes®) y se dejaron secar durante al menos 3 días (Figura 15).

Posterior a elaborar las diluciones se prepararon las placas con el DNA y reactivos necesarios para analizar en el equipo de PCR-TR (Tabla V).

**Tabla V. Material y equipo requerido para la preparación de las muestras de DNA para PCR-TR**

<b>Material y equipo requerido</b>	
Paños de baja pelusa (Kimwipes®)	Placas de 96 pocillos (Applied Biosystem®)
Micropipeta (0-10 µL)	Puntillas para micropipeta (0-10 µL)
Micropipeta (10-100 µL)	Puntillas para micropipeta (10-100 µL)
Pipeta multicanal (0-10 µL)	Puntillas para pipeta multicanal
Tubos Eppendorf de 1.5 ml	Vórtex
Agua libre de DNAasa	Cubierta adhesiva para placas TaqMan
Microcentrífuga	NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer
PCR-Cooler (Eppendorf)	Cuadro de plástico adhesivo para cerrar las placas
Placa maestra de 96 pocillos (Applied Biosystem®)	Centrífuga para microtubos



**Figura 12. Metodología para la obtención de los genotipos de los SNP's mediante la técnica PCR-TR.**

### **Preparación del Mix de Reacción**

Cada uno de los pocillos de las reacciones (una muestra por paciente) que se analizaron por PCR-TR contenían 6  $\mu\text{L}$  de la dilución de 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de DNA, que fue deshidratado a temperatura ambiente durante 3 días o más, 2.5  $\mu\text{L}$  de TaqMan Master Mix (que contiene enzima, DNTP's, magnesio y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados), 0.130  $\mu\text{L}$  de sondas y 2.370  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (DNasa), para un volumen final de 5  $\mu\text{L}$ . Debido a que las cantidades para cada pocillo son muy pequeñas, se elaboró un Mix de todas las muestras que se necesitarían por placa (tabla VI).



**Tabla VI. Cálculo de las cantidades de los reactivos del mix de la reacción**

<b>Reactivo</b>	<b>1 reacción</b>	<b>96 reacciones</b>	<b>110 reacciones</b>
	<b>(<math>\mu</math>L)</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>	<b>(<math>\mu</math>L)*</b>
<b>TaqMan Master Mix</b>	2.5	240	275
<b>Sonda</b>	0.130	12.48	14.3
<b>H<sub>2</sub>O libre de DNAasa</b>	2.370	227.52	260.7

\*Para considerar pérdidas posible por pipeteo, se calculó para 110 reacciones.

### *Procedimiento para la elaboración de las placas*

- Cuando el DNA contenido en cada pocillo se secó, se procedió a preparar el mix en frío para la reacción de PCR-TR y se realizó el cálculo del mix que se necesitaba para cada placa (tabla VI).
- Las sondas se descongelaron en hielo junto con el master mix y el agua libre de DNAasas.
- En un tubo Eppendorf con capacidad para 1.5 ml se mezclaron los reactivos manteniendo a las sondas sin exposición a la luz solar, colocándoles aluminio alrededor del tubo.
- Al mix de reacción se le aplicó un vórtex suave y posterior centrifugación (2 segundos) para que la solución precipitara.
- Se distribuyó el mix de reacción en una tira de tubos para PCR (Eppendorf®) de 8 tubos y se aplicó un vórtex suave y posterior centrifugación (2 segundos) para que la solución precipite.
- Con el apoyo de la pipeta multicanal se aspiraron 5  $\mu$ L del mix de reacción y se depositaron en los pocillos de las placas con DNA seco (es importante que las placas estén en frío, por lo que se empleó un cooler para PCR) (figura 13).
- Al término del llenado de cada placa, ésta se cubrió con cubierta transparente adhesiva y con el apoyo del cuadro de plástico de sello cada pozo, cuidando muy bien cubrir las orillas.
- Se les aplicó vórtex para homogenizar y evitar burbujas que pudieran interferir con la lectura que realiza el aparato. Luego se centrifugó cada

placa y cubrió con papel aluminio para evitar que la exposición solar ocasionara reacción en los reactivos.

- Las placas se refrigeraron hasta que estuvieran listas todas y una vez terminadas, se llevó a cabo el análisis mediante el equipo PCR-TR en el sistema StepOne Plus PCR-RT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).



**Figura 13. Representación de las placas de 96 pocillos empleadas en PCR-TR**

El protocolo de amplificación para la PCR-TR se muestra en la tabla VII.

**Tabla VII. Condiciones de amplificación en el equipo PCR-TR en el sistema StepOne Plus PCR-RT (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).**

<b>Etap</b>	<b>Número de ciclos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1	1	30 s	60
2	1	10 min	95
3	45	15 s	95
		1 min	60
4	1	30 s	60

s= segundo, min= minutos

### **7.2.7 Análisis estadístico**

Al terminar el reclutamiento de las pacientes y recopilar datos de otras pacientes previamente evaluadas, se integró una base de datos, para que se pudiera realizar el análisis estadístico descriptivo. Los valores resultados son medias y desviaciones estándar. Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos se reportaron en porcentajes y para comprobar que la composición genética de la población estuviera en equilibrio se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Iniesta, et. al., 2005).

La asociación de los polimorfismos con la DMO se determinó utilizando el modelo estadístico de regresión lineal simple, con los tres modelos de herencia: aditivo, recesivo y dominante, ajustando por edad e índice de masa corporal (IMC). Se consideró estadísticamente significativo los valores de probabilidad menores a 0.05 ( $p < 0.05$ ).

Para el análisis estadístico se utilizó el software del paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) V.22 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

## 8. RESULTADOS

Se reclutaron 198 pacientes de las cuales se descartaron 24 debido a que no se logró obtener el expediente completo; algunas carecían de datos de la densidad mineral ósea, eran pacientes con parentesco familiar, no se pudo obtener la muestra de sangre o la muestra de DNA no era apta para realizar la genotipificación. A esta muestra de pacientes se les agregaron 58 más, de una base de datos previamente realizada para obtener un total de 232 mujeres mexicanas postmenopáusicas de edades entre 45 a 78 años. Las características generales de la población se presentan en la tabla VIII.

**Tabla VIII. Características generales de la población estudiada.**

Variable	Media (DE)
Edad (años)	57.07 (6.91)
Peso (kg)	70.23 (12.28)
Estatura (cm)	155.87 (5.96)
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.93 (4.96)
Grasa corporal (%)	44.74 (5.85)
Presión sistólica (mm/Hg)	121.072 (18.321)
Presión diastólica (mm/Hg)	74.643 (12.341)
<i>DMO (g/cm<sup>2</sup>)</i>	
DMO_CT	1.087 (0.094)
DMO_FD	0.919 (0.135)
DMO_FI	0.911 (0.133)
DMO_CF	0.892 (0.122)
DMO_DF	0.951 (0.148)
DMO_L2-L4	1.041 (0.164)
DMO_TW	0.728 (0.144)
DMO_T	0.766 (0.116)

N= 232

DMO= densidad mineral ósea, DMO\_CT= DMO en cuerpo total, DMO\_FD= DMO en fémur derecho, DMO\_FI = DMO en fémur izquierdo, DMO\_CF= DMO de cuello femoral, DMO\_DF= DMO en dual de fémur, DMO\_L2-L4 = DMO en lumbar 2 – lumbar 4, DMO\_TW = DMO en triángulo de Wards, DMO\_T = DMO en trocánter. N= número de pacientes. DE = desviación estándar.

### **8.1 Determinación de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de los genes *MTHFR* y *CBS***

En la tabla IX se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos analizados. Además, se muestra el equilibrio de Hardy-Weinberg de tales SNP's.

Con respecto al gen *MTHFR*, el genotipo con mayor frecuencia del polimorfismo A1298C fue el homocigoto AA con un 59.6% y el alelo C fue el de menor frecuencia (minor allele frecuencia, MAF) con un 21.96%. Para el polimorfismo C677T, el genotipo con mayor frecuencia fue el heterocigoto CT con 52.9%, el alelo T fue el MAF con una frecuencia del 42%.

En relación al polimorfismo 844ins68 del gen *CBS*, el genotipo de mayor frecuencia fue DD representando el 83% del total; el MAF fue I con una frecuencia del 8.7%.

Las frecuencias de los genotipos analizados indican que los polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ya que muestran valores de P superiores a 0.05.

**Tabla IX. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* en mujeres mexicanas postmenopáusicas.**

<b>Polimorfismos</b>	<b>CBS</b>			<b>MTHFR</b>					
	<b>844ins68</b>			<b>A1298C</b>			<b>C677T</b>		
	<b>Genotipo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Genotipo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Genotipo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Frecuencias genotípicas y alélicas</b>	<b>DD</b>	191	83	<b>AA</b>	137	59.6	<b>CC</b>	71	31.6
	<b>ID</b>	38	16.60	<b>AC</b>	85	36.9	<b>CT</b>	119	52.9
	<b>II</b>	1	0.4	<b>CC</b>	8	3.5	<b>TT</b>	35	15.5
	<b>D</b>	420	91.30	<b>A</b>	359	78.04	<b>C</b>	261	58
	<b>I</b>	40	8.70	<b>C</b>	101	21.96	<b>T</b>	189	42
<b>EHW</b>	0.539*			0.405*			0.199*		
<b>N</b>	<b>230</b>			<b>230</b>			<b>225</b>		

N= número de pacientes EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg. \*Cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ).

#### **8.4 Asociación los polimorfismos de los genes *CBS* y *MTHFR* con la densidad mineral ósea**

Para el análisis de la asociación de los polimorfismos de los genes que codifican para las enzimas MTHFR y CBS con la DMO se empleó la prueba estadística de regresión lineal simple; este análisis se realizó también ajustando para las variables confusoras IMC y edad. En cada prueba se analizaron los modelos de herencia aditivo (11 vs 12 vs 22), dominante (11 vs 12 + 22) y recesivo (11 + 12 vs 22).

En las tablas X, XI y XII se muestran los valores de DMO (media y DE) en las diferentes regiones del cuerpo de cada genotipo analizado. También se muestran los valores de  $\beta$  e intervalos de confianza (IC) que resultaron de los análisis de regresión lineal simple.

En la tabla X se muestra la asociación del polimorfismo 844ins68 de la CBS con la DMO de diferentes regiones del cuerpo. Ya que se encontró solamente un paciente con el genotipo II, éste se agrupó con el heterocigoto ID por lo que solamente se pudo analizar el modelo dominante. No se encontraron asociaciones significativas entre la DMO y el polimorfismo analizado.

Al evaluar la asociación de los polimorfismos A1298C y C677T de MTHFR con la DMO, no se encontraron asociaciones significativas (tablas X y XI); es decir, la DMO de las regiones estudiadas (cuerpo total, cadera, columna, triángulo de Wards y trocánter) son similares entre los diferentes genotipos. Solamente con el SNP C677T, al analizar la DMO\_L2-L4 con los valores ajustados para IMC y edad se encontró cierta tendencia a una DMO disminuída ( $p = 0.070$ ).

**Tabla X. Asociación del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.**

Región	Genotipos		$\beta$ intervalos de confianza	Valor de P <sup>a</sup>
	DD	ID		
<b>DMO_CT</b>	(Media, DE) 1.088 (0.957)	(Media, DE) 1.082 (0.089)	-0.009 (-0.036, 0.018)	0.510
<b>DMO_FD</b>	0.920 (0.138)	0.913 (0.124)	-0.010 (-0.049, 0.029)	0.619
<b>DMO_FI</b>	0.915 (0.134)	0.896 (0.132)	-0.021 (-0.061, 0.019)	0.294
<b>DMO_L2-L4</b>	1.043 (0.167)	1.032 (0.144)	-0.012 (-0.065, 0.040)	0.646
<b>DMO_CF</b>	0.893 (0.122)	0.890 (0.089)	-0.008 (-0.044, 0.029)	0.678
<b>DMO_W</b>	0.920 (0.138)	0.913 (0.124)	-0.008 (-0.051, 0.035)	0.714
<b>DMO_T</b>	0.765 (0.115)	0.778 (0.126)	0.012 (-0.024, 0.047)	0.521
<b>DMO_DF</b>	0.952 (0.137)	0.956 (0.198)	0.019 (-0.039, 0.023)	0.721

N=230

\*Debido a la baja frecuencia del genotipo II solo se realizó el análisis en el modelo de herencia dominante.

DMO= densidad mineral ósea, DMO\_CT= DMO en cuerpo total, DMO\_FD= DMO en fémur derecho, DMO\_FI = DMO en fémur izquierdo, DMO\_CF= cuello femoral, DMO\_DF= dual de fémur, DMO\_L2-L4 = DMO en lumbar 2 – lumbar 4, DMO\_TW = DMO en triángulo de Wards, DMO\_T = DMO en trocánter. N= número de pacientes. DE = desviación estándar. Valor de P<sup>a</sup>= P ajustada a IMC y edad.



**XI. Asociación del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.**

Región	Genotipos			$\beta$ (95% IC)	P <sup>a</sup>	Modelo
	AA (n=137)	AC (n=85)	CC (n=8)			
DMO_CT	(Media, DE) 1.087 (0.094)	(Media, DE) 1.089(0.089)	(Media, DE) 1.089 (0.106)	-0.001 (-0.019, 0.017)	0.935	Aditivo
				0.001 (-0.054, 0.057)	0.964	Recesivo
				-0.001 (-0.021, 0.019)	0.914	Dominante
DMO_FD	0.918 (0.131)	0.919 (0.137)	0.943 (0.182)	-0.003 (-0.029, 0.024)	0.827	Aditivo
				0.008 (-0.075, 0.090)	0.855	Recesivo
				-0.005 (-0.035, 0.025)	0.752	Dominante
DMO_FI	0.910 (0.133)	0.911 (0.127)	0.946 (0.177)	-0.001 (-0.028, 0.026)	0.951	Aditivo
				0.020 (-0.063, 0.103)	0.642	Recesivo
				-0.004 (-0.034, 0.027)	0.810	Dominante
DMO_L2-L4	1.039 (0.167)	1.046 (0.153)	1.063 (0.226)	0.004 (-0.032, 0.039)	0.835	Aditivo
				0.013 (-0.097, 0.124)	0.813	Recesivo
				0.003 (-0.037, 0.044)	0.880	Dominante
DMO_CF	0.892 (0.124)	0.891 (0.116)	0.916 (0.138)	0.002 (-0.022, 0.026)	0.879	Aditivo
				0.032 (-0.044, 0.107)	0.409	Recesivo
				-0.002 (-0.030, 0.026)	0.898	Dominante
DMO_W	0.729 (0.142)	0.727 (0.142)	0.749 (0.202)	0.001 (-0.028, 0.030)	0.942	Aditivo
				0.036 (-0.053, 0.125)	0.426	Recesivo
				-0.003 (-0.036, 0.029)	0.835	Dominante
DMO_T	0.763 (0.115)	0.773 (0.117)	0.759 (0.133)	0 (-0.024, 0.024)	0.987	Aditivo
				-0.022 (-0.096, 0.053)	0.566	Recesivo
				0.003 (-0.024, 0.030)	0.819	Dominante
DMO_DF	0.946 (0.146)	0.964 (0.154)	0.919 (0.130)	0.011 (-0.024, 0.045)	0.540	Aditivo
				-0.018 (-0.125, 0.088)	0.734	Recesivo
				0.016 (-0.023, 0.055)	0.411	Dominante

N=230

DMO= densidad mineral ósea, DMO\_CT= DMO en cuerpo total, DMO\_FD= DMO en fémur derecho, DMO\_FI = DMO en fémur izquierdo, DMO\_CF= cuello femoral, DMO\_DF= dual de fémur, DMO\_L2-L4 = DMO en lumbar 2 – lumbar 4, DMO\_TW = DMO en triángulo de Wards, DMO\_T = DMO en trocánter. N= número de pacientes. DE = desviación estándar. Valor de P<sup>a</sup>= P ajustada a IMC y edad.

**Tabla XII. Asociación del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas postmenopáusicas.**

Región	Genotipos			$\beta$ (95% IC)	P	Modelo
	CC (n=71)	CT (n=119)	TT (n=35)			
<b>DMO_CT</b>	<b>(Media, DE)</b> 1.087 (0.094)	<b>(Media, DE)</b> 1.093 (0.094)	<b>(Media, DE)</b> 1.086 (0.080)	-0.005 (-0.020, 0.010)	0.504	Aditivo
				-0.014 (-0.041, 0.014)	0.340	Recesivo
				-0.002 (-0.024, 0.019)	0.829	Dominante
<b>DMO_FD</b>	0.919 (0.143)	0.927 (0.133)	0.901 (0.131)	-0.011 (-0.034, 0.011)	0.317	Aditivo
				-0.034 (-0.075, 0.007)	0.108	Recesivo
				-0.003 (-0.035, 0.029)	0.851	Dominante
<b>DMO_FI</b>	0.919 (0.137)	0.914 (0.130)	0.899 (0.129)	-0.013 (-0.035, 0.010)	0.274	Aditivo
				-0.026 (-0.068, 0.016)	0.226	Recesivo
				-0.010 (-0.043, 0.022)	0.532	Dominante
<b>DMO_L2-L4</b>	1.033 (0.156)	1.060 (0.168)	1.008 (0.156)	-0.010 (-0.040, 0.019)	0.500	Aditivo
				-0.050 (-0.105, 0.004)	<b>0.070</b>	Recesivo
				0.009 (-0.033, 0.052)	0.664	Dominante
<b>DMO_CF</b>	0.892 (0.123)	0.895 (0.122)	0.884 (0.112)	-0.010 (-0.031, 0.010)	0.327	Aditivo
				-0.023 (-0.061, 0.015)	0.229	Recesivo
				-0.007 (-0.037, 0.022)	0.639	Dominante
<b>DMO_W</b>	0.734 (0.142)	0.724 (0.146)	0.729 (0.129)	-0.014 (-0.038, 0.010)	0.249	Aditivo
				-0.015 (-0.060, 0.029)	0.504	Recesivo
				-0.020 (-0.054, 0.015)	0.259	Dominante
<b>DMO_T</b>	0.765 (0.113)	0.770 (0.116)	0.760 (0.119)	-0.008 (-0.028, 0.013)	0.459	Aditivo
				-0.018 (-0.055, 0.020)	0.359	Recesivo
				-0.005 (-0.034, 0.024)	0.728	Dominante
<b>DMO_DF</b>	0.954 (0.134)	0.959 (0.164)	0.921 (0.117)	-0.015 (-0.044, 0.014)	0.325	Aditivo
				-0.041 (-0.094, 0.013)	0.135	Recesivo
				-0.005 (-0.047, 0.036)	0.803	Dominante

N=225

DMO= densidad mineral ósea, DMO\_CT= DMO en cuerpo total, DMO\_FD= DMO en fémur derecho, DMO\_FI = DMO en fémur izquierdo, DMO\_CF= cuello femoral, DMO\_DF= dual de fémur, DMO\_L2-L4 = DMO en lumbar 2 – lumbar 4, DMO\_TW = DMO en triángulo de Wards, DMO\_T = DMO en trocánter. N= número de pacientes. DE = desviación estándar. Valor de P<sup>a</sup>= P ajustada a IMC y edad.

## 9. DISCUSIÓN

La OP es una enfermedad metabólica progresiva del esqueleto y se caracteriza por una densidad mineral ósea baja y disminución de la calidad de los huesos. En consecuencia, el riesgo de sufrir fracturas osteoporóticas se incrementa. Conforme el tiempo pasa, como parte del envejecimiento normal, los huesos son más porosos y frágiles, por lo que el riesgo a fracturas aumenta considerablemente incluso tras caídas leves durante actividades cotidianas (IOF, 2015; Nava González, et. al. 2013; Urano & Inoue, 2014).

La pérdida de ósea (cuando se absorbe más hueso de lo que se produce) no presenta signos o dolor alguno y ocurre de manera crónica, generalmente el primer dolor se produce con la primera fractura, que generalmente, es en los huesos de la muñeca, el húmero, la pelvis, la cadera y la columna vertebral (IOF, 2015).

Estudios epidemiológicos en México, demuestran que las frecuencias de fracturas en cadera y vértebras van en aumento. Se estima que 1 de cada 12 mexicanas y 1 de cada 20 mexicanos presentarán fractura de cadera después de los 50 años (Clark, et. al. 2013).

En una muestra aleatoria del LAVOS se analizó la DMO en columna lumbar y fémur de 807 mujeres y hombres mexicanos (Clark, et. al. 2013). Los resultados evidenciaron que el 9% y 17% de hombres y mujeres, respectivamente tenían osteoporosis en la columna lumbar y que el 30% y 43% de hombres y mujeres mostraron osteopenia. También se demostró que el 6% de hombres y el 16% de mujeres tenían osteoporosis en fémur.

La OP es una enfermedad multifactorial; en la que participan tanto factores ambientales (estilo de vida, dieta, etc) como genéticos (Clarke, et. al. 2014; Yang Huang & Chee Kung, 2006). Entre los genes que participan en la etiología de la OP destacan el receptor de la vitamina D (*VDR*) y el receptor de estrógenos

(*ESR1*). Recientemente se ha descrito que la DMO se relaciona con el metabolismo del folato, donde participan las enzimas Cistationina  $\beta$  sintasa (CBS) y metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR). Alessio y colaboradores sugirieron que el polimorfismo 844ins68 del gen de la CBS y los polimorfismos C677T y A1298C del gen de la MTHFR están asociados con el incremento de tHcy (Alessio, et. al., 2008), que a su vez, está asociada con DMO disminuída (Bucciarelli, et. al. 2010; McLean & Hannan, 2007).

Por lo anterior, para este trabajo se planteó el objetivo de analizar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* con la DMO en mujeres postmenopáusicas.

Como primer objetivo, a las participantes se les determinó la DMO de diferentes regiones corporales mediante la técnica de densitometría dual de rayos X. Los resultados encontrados fueron contrastados con los de otros autores y se muestran en la tabla XIII; en general, los valores de DMO de nuestro estudio, son superiores a los reportados en la población mexicana por otros investigadores. Los valores de DMO de cuello femoral que se encontraron fueron similares a los descritos por Velázquez Cruz y colaboradores (2014) en un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas mexicanas; sin embargo, la DMO en lumbares y triángulo de Wards fue más elevada en este estudio. Delezé y colaboradores (2000), estudiaron la DMO de mujeres mexicanas de 10 ciudades diferentes de México 5 en el norte, 4 en el centro 1 al sureste; en el norte las ciudades fueron Mexicali, Monterrey, Obregón, Hermosillo y Durango; ellos encontraron que la DMO de espina lumbar fue más alta en mujeres del norte del país con 1.089 g/cm<sup>2</sup>, intermedia en el centro 1.065 g/cm<sup>2</sup> y baja en el sur del país con 1.013 g/cm<sup>2</sup>; lo mismo sucede para la región de cuello femoral con valores de DMO más altos en el norte, intermedios en el centro e inferiores en el sur. Se debe tener cierta cautela al comparar estos resultados con los nuestros ya que se trata de mujeres con rango de edad diferente.

**Tabla XIII. Densidad mineral ósea en diferentes poblaciones.**

Referencia	Grupo de estudio	Población		DMO_CF	DMO_L2-L4	DMO_DF	DMO_TW
<b>Nuestro estudio</b>	232 MPP Edad 57.07 años	Mexicanas de Monterrey área metropolitana		0.892 (0.122)	1.041 (0.164)	0.951 (0.148)	0.728 (0.144)
<b>Velázquez-Cruz, et al., 2014</b>	425 MPP Edad 62 años	Mexicanas (de Cuernavaca)		0.878 (0.125)	0.997 (0.151)	0.927 (0.133)	0.708 (0.142)
<b>Delezé et al., 2000</b>	4 460 mujeres Edad 20-90 años	1 307	Norte (Mexicali, Monterrey, Obregón, Hermosillo y Durango)	0.895 (0.14)	1.089 (0.18)	-----	-----
		2 228	Centro (Guadalajara, Leon, Cd. México y Puebla)	0.864 (0.14)	1.065 (0.17)	-----	-----
		925	Sur (Mérida)	0.844 (0.14)	1.013 (0.19)	-----	-----
<b>Jeon et al., 2011</b>	931 MPP Edad 51.2 años	Japonesas		0.896 (0.004)	-----	-----	-----
<b>Golbahar et al., 2005</b>	336 MPP Edad 60.9 años	Iranies		0.76 (0.13)	0.930 (0.180)	-----	-----
<b>Valente Da Silva et al., 2007)</b>	289 MPP con edad 53.9 años	Brasileña		0.798 (0.113)	0.992 (0.178)	-----	-----

DMO= densidad mineral ósea, MPP= mujeres postmenopáusicas, DMO\_CF= DMO en cuello femoral, DMO\_L2-L4 = DMO en lumbar 2 – lumbar 4, DMO\_DF = DMO en dual de fémur, DMO\_TW = DMO en triángulo de Wards.

En ese reporte, los investigadores reconocen que las mujeres del norte de México son más altas y con mayor IMC que en el resto del país (norte, centro y sur es de 27.0 kg/m<sup>2</sup>, 25.7 kg/m<sup>2</sup>, 26.6 kg/m<sup>2</sup>, respectivamente). La obesidad se relaciona con alta DMO en cuello femoral e incremento de masa ósea, posiblemente por un mayor esfuerzo mecánico del cuerpo y elevados niveles de estrógenos (Murillo Uribe, y otros, 1998). Los andrógenos en el tejido adiposo pueden transformarse a estrógenos proporcionando una mayor reserva de estrógenos a las mujeres postmenopáusicas con obesidad (Deleze, y otros, 2000). La DMO en el grupo de mujeres mayores de 35 años con sobrepeso es significativamente

mayor a las pacientes de la misma edad pero con IMC menor en cadera y columna (Murillo Uribe, y otros, 1998).

Además de los factores antes mencionados que pueden relacionarse con fluctuaciones en la DMO, también influye la ancestría heterogénea de la población, ya que en México existen una alta proporción de población indígena, seguida de la raza blanca (europea) y finalmente una baja proporción de raza negra (africana). Por lo tanto, se evidencia que la heterogeneidad de la población, aunado al estilo de vida y nutrición, son factores que hacen variar la DMO (Delezé et al., 2000; Velázquez Cruz et al., 2014). Las personas de raza negra tienen del 8-14% mayor DMO que la raza blanca contemplando el mismo género, y los caucásicos tienen la DMO más elevada que los japoneses (Delezé et al., 2000).

En otros países también se ha evaluado la DMO. En Brasil, en un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas se reportaron valores inferiores de DMO en regiones de cuello femoral y espina lumbar con respecto a nuestro estudio (Valente Da Silva, Mendoca, Conceicao, Zahar, & Farias, 2007). En Japón, se analizó la DMO de mujeres postmenopáusicas con un promedio de edad de 51.2 años; los valores de DMO de cuello femoral encontrados en este estudio fueron muy similares al nuestro  $0.896 \text{ g/cm}^2$  y  $0.892 \text{ g/cm}^2$ , respectivamente (Jeon et al. 2011). Un estudio realizado por Golbahar, Aminzadeh, Hamidi y Omrani (2005) en mujeres postmenopáusicas iraníes con edad media de 60.8 (7.4) evidenció resultados inferiores de DMO en cuello femoral y espina lumbar, respecto a nuestros resultados.

Con lo anterior podemos concluir que la DMO en el país, varía según la región geográfica, siendo más alta en el norte. Esto resulta de la interacción de varios factores como: estilo de vida, composición corporal, heterogeneidad de la ancestría de la población mexicana. Por lo que la situación ancestral de la población de estudio puede resultar como variable confusora al asociar la DMO con los factores genéticos.

Como segundo objetivo, se analizó la frecuencia de los alelos y genotipos de los polimorfismos de los genes en este trabajo. Para el polimorfismo 844ins68 del gen *CBS*, las frecuencias genotípicas encontradas fueron similares ( $P>0.05$ ), a las reportadas por Gallegos-Arreola et al. (2014) en mujeres mexicanas procedentes de Guadalajara y su área metropolitana, con la presencia de 1% para el genotipo de riesgo II, así como para la población Italiana (Pepe et al., 1999) brasileña (Franco, et. al., 1998), china (Pei, 2011) y Turca (Akar, Akar, Deda, & Arsan S., 2000) (tabla XIV).

Cabe señalar, que este polimorfismo ha sido poco estudiado en la población mexicana, por lo tanto, contar con información actual de su frecuencia, como se reporta en este estudio, será de utilidad como referencia para estudios posteriores.

**Tabla XIV. Frecuencia (%) del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* en diferentes poblaciones.**

<b>Frecuencias (%) 844ins68</b>	<b>Población estudiada</b>	<b>Brasil <sup>1</sup></b>	<b>Guadalajara y el área metrópoli- tana* <sup>2</sup></b>	<b>Italianos* <sup>3</sup></b>	<b>Brasil* <sup>4</sup></b>	<b>China*<sup>5</sup></b>	<b>Turquía*<sup>6</sup></b>
<b>DD</b>	83	69	86	85.6	80.2	78.94	84
<b>ID</b>	16.60	26.6	13	13.6	16.8	19.29	16
<b>II</b>	0.40	4.7	1	0.8	3	1.75	0
<b>D</b>	91.30	82	93	92.35	88.61	82.35	86
<b>I</b>	8.70	18	7	7.64	11.38	17.64	14
<b>Población</b>	232 MPP mexicanas	150 mujeres	371 mujeres mexicanas	595 hombres y mujeres	101 hombres y mujeres	68 hombres y mujeres	74 hombres y mujeres

\* Resultados similares con una  $P > 0.05$  ( $\chi^2$ ).

1 (Villas Boas, Olivera Goncalves, Nunes Costa, & Souza Goncalves, 2015)

2 (Gallegos-Arreola et al., 2014)

3 (Pepe, et al., 1999)

4 (Franco, et. al., 1998)

5 (Pei, 2011)

6 (Akar, Akar, Deda, & Arsan S., 2000)

También se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP's A1298C y C677T del gen de la MTHFR en las mujeres postmenopáusicas. En el caso del polimorfismo A1298C, hay pocos estudios ya que en los trabajos previos no se encuentra asociado a fenotipos específicos o condiciones patológicas. En nuestro estudio, se encontró una frecuencia del 3.5% para el homocigoto de riesgo CC y para el alelo C la frecuencia fue de un 21.96%. A continuación se realizan comparaciones con los resultados encontrados en otros trabajos (tabla XV).

En el occidente de México, González-Mercado y otros (2014) reportaron frecuencias de 57, 34 y 9% para los genotipos AA, AC y CC, respectivamente. En Nuevo León, Delgado-Enciso y colaboradores (2006) reportan al homocigoto



CC con una frecuencia del 2.2% y del AA del 71.9%. En ambos estudios, los resultados son similares a los encontrados en este trabajo ( $P>0.05$ ). De acuerdo Contreras Cubas y colaboradores (2016) la frecuencia de 1298C en la población mestiza Mexicana fue de 14% para el alelo C y 2% para el genotipo CC, en la población mexicana amerindia fue de 6% para el alelo C y 0.4% para el genotipo CC, siendo éstas, de las frecuencias más bajas que se reportaron a nivel mundial. Para la población mestiza las frecuencias resultaron similares a las reportadas por este estudio ( $P>0.05$ ).

Por otra parte, a nivel mundial también se analiza la frecuencia del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR* y algunos de los resultados son los siguientes. Esfahani, Cogger, & Caudill (2003) estudiaron una muestra de la población mexicana que reside en los Ángeles; sus resultados coinciden con lo reportado por nuestro estudio al encontrar una frecuencia del 20.20 % para el alelo C ( $P>0.05$ ). En la población de Brasil se reportó una frecuencia muy baja (5.3%) para el homocigoto de riesgo CC (Vilas Boas, Olivera Goncalves, Nunes Costa, & Souza Goncalves, 2015), también comparable a la encontrada en nuestro estudio. En Estados Unidos, según la tercera Encuesta Nacional de Salud y Evaluación Nutricia (NHANES III) en diversos grupos étnicos se analizó la frecuencia del alelo C y se encontró que el grupo de mexicoamericanos obtuvo una frecuencia 18.9% y los no hispanicos negros de 17.9%; en ese estudio se reportó una de las frecuencias más altas para el alelo C ya que se reportó que la población no hispanica blanca presentó una frecuencia del 31.2% ( $P>.05$ ) (Yang, et. al., 2008).

**Tabla XV. Frecuencia (%) del polimorfismo A1298C del gen *MTHFR* en diferentes poblaciones.**

Frecuencias (%) A1298C	Población estudiada	Brasil* <sup>1</sup>	No Hispanicos blancos* <sup>2</sup>	No hispanicos negros* <sup>2</sup>	Americanos mexicanos* <sup>2</sup>	Occidente de México* <sup>3</sup>	Población de los Ángeles* <sup>4</sup>	Población de NL* <sup>5</sup>	Población mestiza* <sup>6</sup>	Población Amerindia <sup>6</sup>
<b>AA</b>	59.6	53.4	47.9	67.6	65.7	57	62.2	71.91	74	88.6
<b>AC</b>	36.9	41	41.8	29.0	30.8	34	35.2	25.84	24	11
<b>CC</b>	3.5	5.3	10.3	3.4	3.5	9	2.6	2.24	2	0.4
<b>A</b>	78.04	74	68.8	82.1	81.1	74	79.8	84.83	86	94
<b>C</b>	21.96	26	31.2	17.9	18.9	26	20.2	15.16	14	6
<b>Tipo de estudio</b>	Postmeno páusicas	150 Mujeres brasileñas	6784 Hombres y mujeres estadounidenses			102 Hombres y mujeres adultos	193 mexicanas	89 mujeres	638 hombres y mujeres	2026 hombres y mujeres

\* Resultados similares con una  $P > 0.05$  ( $\chi^2$ ).

1 (Villas Boas, Olivera Goncalves, Nunes Costa, & Souza Goncalves, 2015)

2 (Yang et al., 2008)

3 (González-Mercado, et al., 2014)

4 (Esfahani, et. al., 2003)

5 (Delgado-Enciso et al., 2006)

6 (Contreras Cubas, y otros, 2016)

Con respecto al SNP C677T del gen *MTHFR*, se encontró que el genotipo CC y el alelo C son los que presentaron con mayor frecuencia en nuestra muestra. Cabe señalar que de este polimorfismo, el alelo T es considerado marcador genético para enfermedades cardiovasculares y para defectos de tubo neural, lo que explica la gran cantidad de literatura que hay al respecto de este tema a nivel nacional e internacional.

A nivel nacional, Dávalos y colaboradores (2000) encontraron que el alelo T se presentó con frecuencias de 44% en población mestiza de Guadalajara, 56% en Huicholes nativos y 57% en Purépechas. La investigación de Mutchinick y colaboradores (1999) reportan una frecuencia del alelo T del 58% y la presencia del homocigoto TT en un 35% en mujeres sanas. Estos investigadores sostienen que la frecuencia del polimorfismo C677T es alta en toda la República Mexicana, debido a la uniforme distribución del homocigoto T, por lo cual afirman que uno de cada tres individuos sanos pudiera tener la expresión termolábil (TT) del gen *MTHFR*.

De acuerdo a lo ya descrito por Contreras Cubas y colaboradores (2016), por la distribución geográfica de este polimorfismo se observa que hay mayor prevalencia del alelo T en el sur del país. González-Herrera et al. (2002) informan de una frecuencia del 54% para el alelo T y del 30% del homocigoto TT en el sur de México; en cambio, Delgado-Enciso et al. (2006), observaron una cifra del 22.5% para el homocigoto TT y una frecuencia del alelo T de 50% en el norte de México, frecuencias más bajas para el homocigoto TT en comparación con las reportadas en el centro y sur de México. Por su parte, Esfahani y colaboradores (2003), reportaron que al norte del país, la frecuencia del alelo de riesgo disminuían, con 18.1% para el homocigoto TT en mujeres de descendencia mexicana. Por último Aguirre-Rodríguez, Martínez de Villarreal, Velázquez-Campos & Sampollo-Hernández, (2008) afirmaron que el gradiente del polimorfismo en México muestra una prevalencia descendente de sur a norte, hasta llegar a los Estados Unidos de América, donde se presentaron las

frecuencias más bajas del genotipo TT, similar a lo reportado por Audiffred Jaramilo, García Cobián, García de Alba García & Rubio Arellano (2016).

En el estado de Nuevo León, también se han realizado trabajos con el polimorfismo C677T del gen de MTHFR. Aguirre- Rodríguez y colaboradores (2008), reportaron una proporción de homocigotos TT del 19.7% con una frecuencia del alelo T de 47%, Delgado-Enciso y colaboradores (2006) reportaron una frecuencia de 22.5% para el homocigoto de riesgo TT, y una frecuencia del 50% para el alelo T, similar a nuestro estudio (42%).

México es uno de los países a con mayores frecuencias reportadas por el SNP C677T del gen *MTHFR* (Antonio-Véjar, et. al., 2014), la cuál puede variar de 36 a 58% (Mutchinik, López, Luna, Waxman & Babinsky, 1999; Dávalos et al., 2000; González-Herrera et al., 2002). Sin embargo, como analizamos en este estudio, la zona geográfica del país y la ancestría de la población influyen mucho en la presencia del alelo T. Son muy pocos los estudios que reportan la frecuencia del SNP A1298C en México de acuerdo a los diferentes grupos étnicos, sólo se ha reportado el grupo mestizo con presencia de 14 a 21 % para el genotipo AC (Contreras Cubas, et. al., 2016; Guéant-Rodríguez et al., 2006; González-Herrera et al., 2007).

A nivel mundial, la distribución de la frecuencia del alelo 677T del polimorfismo C677T es variable con rangos desde el 10% en población de África y Oceanía hasta más del 40% en población amerindios brasileños (Schneider, Rees, Liu & Clegg 1998); por ejemplo, en población China la frecuencia del genotipo TT es de 14.3% en mujeres postmenopáusicas (Hong, y otros, 2007), siendo significativamente similar al estimado en población mexicana de este estudio ( $P > 0.05$ ). Al comparar los resultados de trabajos a nivel mundial con los reportados en este estudio, la frecuencia del alelo T del 42% parece superar al reportado por el este de Asia, Sur Asia y África con un 30% (Ensembl, 2016).

Como se puede observar, la frecuencia del alelo T del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* es muy diversa a nivel nacional e internacional. Más ejemplos de esta variabilidad se presentan en la tabla XVI.

**Tabla XVI. Frecuencia (%) del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en diferentes poblaciones.**

Frecuencias (%) C677T	Población estudiada	Brasil <sup>1</sup>	Población de los Ángeles* <sup>2</sup>	Americanos mexicanos* <sup>3</sup>	China* <sup>4</sup>	Danesas <sup>5</sup>	Población Mexicana* <sup>6</sup>			Población de NL* <sup>7</sup>	Occidente de México* <sup>8</sup>	DF <sup>9</sup>	Guerrero <sup>10</sup>
							Grupo caucásico (europeo. N=20)	Grupos étnicos (huichol, tarahumara y purépecha. N= 109)	Grupo mestizo (N=101)				
<b>CC</b>	31.6	65	37.8	29.9	35.9	48.5	45	26.60	31	22.4	28	17	11.42
<b>CT</b>	52.9	31	44	49.8	49.8	42.8	40	48.62	50	55.1	51	49	42.85
<b>TT</b>	15.5	4	18.1	20.3	14.3	8.7	15	24.77	19	22.5	21	34	45.71
<b>C</b>	58	80	59.8	54.8	60.8	70	65	50.91	56	50	54	41.5	32.85
<b>T</b>	42	20	40.2	45.2	39.2	30	35	49.08	44	50	46	58.5	67.14
<b>Tipo de población</b>	MPP 40 a 80 años	150 mujeres 17 a 40 años	193 mexicanas	2068 mujeres y hombres ≥ 12 años	1899 MPP	1748 MPP				89 hombres y mujeres	102 hombres y mujeres	Hombres y mujeres adultos	Hombres y mujeres adultos

MPP= mujeres postmenopáusicas

\* Resultados similares con una  $P > 0.05$  ( $\chi^2$ ).

1 (Villas Boas, Olivera Goncalves, Nunes Costa, & Souza Goncalves, 2015)

2 (Esfahani, et. al., 2003)

3 (Yang et al., 2008)

4 (Hong et al., 2007)

5 (Abrahamsen et al., 2003)

6 (Dávalos et al., 2000)

7 (Delgado-Enciso et al., 2006)

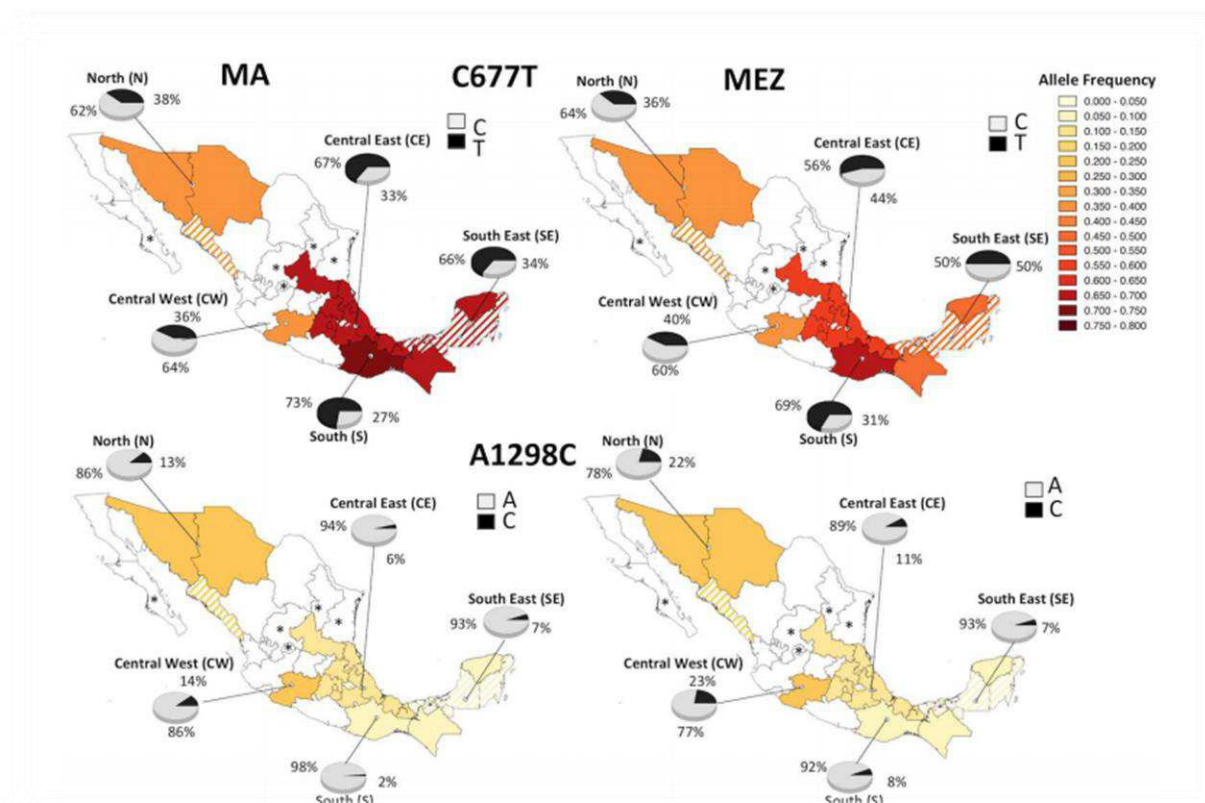
8 (González-Mercado, et al., 2014)

9 (Gallegos-Arreola et al., 2014)

10 (Antonio-Véjar, et. al., 2014)

Los resultados anteriores confirman que en la población mexicana, como en otras poblaciones, cuando prevalece un porcentaje alto de homocigotos TT del SNP C677T (15.6 % en nuestro estudio, con la distribución mundial de 2 a 30%) (Botto & Yang, 2000), se obtiene una de las frecuencias más bajas reportada para los homocigotos 1298CC (3.5 % en nuestro estudio, con distribución mundial de 1.2 a 12.8%) (Robien & Ulrich, 2001). Lo anterior confirma que las personas que portan el homocigoto CC del SNP A1298C, no pueden tener el homocigoto TT del SNP C677T que se confirma con la ausencia del haplotipo 677TT y 1298CC, confirmando que los alelos 677T y 1298C están siempre en *trans*. Los estudios en los que se ha encontrado la relación de la presencia de la mutación C677T y 1298C en el gen de MTHFR son de países con alta prevalencia de defectos en el tubo neural (DTN) como en los localizados en el norte de Europa (Baptista González, 2009; Gutiérrez Revilla, Pérez Hernández, Calvo Martín, Tamparillas Salvador, & Gracia Romero, 2003). Al parecer la evolución compensa la alta frecuencia de la mutación 677T con una baja presencia de 1298C (Delgado-Enciso, y otros, 2006; Reyes-Engel, y otros, 2002).

En la figura 14 se evidencia por estado del país cómo el gradiente del polimorfismo C677T aumenta de norte a sur y por el contrario en el caso del SNP A1298C. A pesar que para el análisis de la región norte del país no se estudió Nuevo León, por la ausencia de población indígena; los porcentajes de frecuencias del alelo 677T y 1298C, son muy similares a los de otros estados del norte analizados (Contreras Cubas, et. al., 2016).



**Figura 14. Distribución de los SNPs C677T y A1298C de acuerdo a la región geográfica y grupos mestizo (MEZ) y amerindio mexicano (MA) del país.** Algunos estados no se tomaron como muestra debido a que no presentaban origen indígena. \*Estados sin población indígena. Fuente Contreras Cubas, et. al. (2016).

Finalmente, en el tercer objetivo de este trabajo se buscó analizar la asociación de los polimorfismos con la DMO; los resultados mostraron que no hay asociación significativa de los polimorfismos 844ins68 del gen *CBS*, A1298C y C677T del gen *MTHFR* con la DMO de mujeres postmenopáusicas. Estos resultados surgen a pesar de que los polimorfismos analizados se han relacionado con hiperhomocisteinemia, y ésta con valores disminuídos de DMO y OP (Shengrong Ouyang, Zhuo, Yuanyuan , & Feifei, 2014). Además, se destaca el papel de ambas enzimas en el metabolismo de la Hcy, como se describió en la sección de antecedentes

En el caso del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS*, no se han realizado estudios nacionales ni internacionales enfocados a la DMO, pero se indaga la pregunta de si su presencia, que se asocia con tHcy, se relaciona también con cambios en la DMO. La enzima CBS tiene un papel importante en el metabolismo de la Hcy, si



la enzima presenta una disminución en su eficiencia, como sucede en la presencia del polimorfismo 844ins68, la tHcy se eleva, lo que permitía suponer que se relacionaría con baja DMO.

De acuerdo a Tsai, Bignell, Schwichtenberg, & Hanson (1996); Wang, et. al., (1999), Dekou, et. al., (2001), la presencia del alelo de Inserción del polimorfismo 844ins68 se ha asociado con un incremento de la actividad de la enzima, por lo tanto con niveles bajos de tHcy.

Por su parte Franchis, et. al., (2000), menciona que la presencia del genotipo heterocigoto ID del polimorfismo 844ins68 junto con la presencia del genotipo TT del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, aumenta el grado de hiperhomocisteinemia.

De acuerdo a Golimbet, Korovaitseva, Abramova, & Kaleda (2009), la presencia del genotipo DD del polimorfismo 844ins68, se asocia con tHcy elevada. En las mujeres, los cambios de los niveles de estrógenos, como sucede en las mujeres postmenopáusicas está asociado con cambios séricos de Hcy. Por lo anterior, y debido los pocos estudios en México de este polimorfismo fue que se llevó a cabo el análisis.

Diversos autores proponen que una de las causas principales de baja DMO es la presencia de tHcy elevada (Bucciarelli, et. al., 2010; Morris, et. al., 2005; Ouzzif, et. al., 2012). Bucciarelli, en el 2010 realizó un estudio en mujeres posmenopáusicas mayores de 65 años y encontró que los niveles altos de Hcy se relacionan con una baja DMO, coincidiendo con el estudio realizado por Gerdhem (2007). Incluso, algunos autores proponen que la tHcy sea considerada como un nuevo factor de riesgo para fracturas osteoporóticas, ya que las mujeres con mayores concentraciones de tHcy tienen el doble de riesgo a fracturas en comparación a las que se encuentran con niveles normales; en el caso de los hombres con elevada concentración de tHcy, tuvieron el cuádruple de riesgo a fractura, en comparación a los que están en niveles normales. Los hombres y

mujeres de edad avanzada (postmenopáusicas) en los rangos más altos de tHcy, tenían el doble de riesgo a fracturas por osteoporosis (McLean & Hannan, 2007).

Con respecto a los polimorfismos A1298C y C677T del gen MTHFR, éstos si se han asociado con osteoporosis, independientemente de las concentraciones tHcy (Baines, et. al., 2007; Weisberg, Tran, Christensen, Sibani, & Rozen, 1998).

Un estudio de casos y controles realizado en Dinamarca por Jorgensen (2002), en mujeres postmenopáusicas con fracturas y sin fracturas, observó que las mujeres con el alelo C presenta asociación con la fractura en cadera; sin embargo, en esta población la presencia del alelo T fue del 35.12%. El estudio de Li, Lau & Woo en China (2004), evidencia que la presencia del genotipo TT del polimorfismo C677T, se asocia con fracturas en columna vertebral. Así como también lo demuestra el estudio de Villadsen y colaboradores, en Dinamarca (2005).

A nivel nacional de acuerdo a (Brambila-Tapia et al., 2012) un grupo de las personas con artritis reumatoide procedentes de Guadalajara, México, que presentaban osteoporosis u osteopenia con la presencia del homocigoto TT del SNP C677T presentó también bajos niveles de DMO con respecto a las personas con el genotipo CT y CC; sin embargo, para el SNP A1298C no se encontró asociación alguna con la DMO. Un estudio realizado por McLean y otros (2004) en hombres y mujeres del estudio de Framingham (1996-2001), asoció significativamente la presencia del polimorfismo C677T con baja DMO en las personas con concentraciones de folato inferiores a 4ng/ml.

En estudio realizado por Urano et al., (2009), en mujeres postmenopáusicas con artritis reumatoide se genotipificaron los SNPs A1298C y C677T del gen MTHFR no encontrando asociación significativa con la incidencia de riesgo a fracturas. En 2008, Shiraki y colaboradores, realizaron un estudio analizando la asociación del SNP C677T y la DMO en mujeres postmenopáusicas japonesas de las cuáles algunas tenían incidencias de fracturas, los resultados afirman que las mujeres

con el genotipo TT tienen mayor incidencia de fracturas y elevada tHcy, independientemente si tenían osteoporosis.

Similar a los resultados encontrados en nuestro estudio, Nissen y colaboradores (2009), en un estudio realizado en mujeres danesas perimenopáusicas no encontraron asociación de la DMO en cuello femoral y cuerpo total respecto a la presencia del SNP C677T. También en el caso del estudio realizado por Golbahar, Aminzadeh, Hamidi, & Omrani, (2005) en el que a mujeres postmenopáusicas de Irán, se les midió la DMO en cuello femoral y espinal lumbar, además de las mediciones antropométricas se evaluaron niveles tHcy y se reportó que la baja presencia del gen *MTHFR* en células rojas no se asoció con una baja DMO. Como se puede observar en tabla VXII se presentan algunos estudios de los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* asociados y no asociados con fracturas óseas.

**Tabla XVII. Estudios de asociación de los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* con la presencia de fracturas.**

Lugar del estudio	Población de estudio	Tipo de fractura	Polimorfismo afectado	Referencia
Dinamarca	Mujeres postmenopáusicas	Fractura de cadera	C677T	Jorgensen, et. al. 2002
Dinamarca	Mujeres postmenopáusicas	Ningún tipo de fractura	C677T	Abrahamsen, et. al. 2003
Dinamarca	Hombres y mujeres	Ningún tipo de fractura	C677T	Bathum, et. al. 2004
China	Hombres y mujeres	Fractura en columna vertebral	C677T	Li, et. al., 2004
Dinamarca	Hombres y mujeres	Fractura en columna vertebral	C677T	Villadsen, et. al., 2005
China	Mujeres postmenopáusicas	Ningún tipo de fractura	C677T	Hong, et. al., 2007
España	Hombres y mujeres	Fractura en cadera y columna	C677T	Valero, et. al. 2007
Japón	Mujeres postmenopáusicas	Ningún tipo de fractura	C677T	Shiraki, et. al. 2008
Países bajos (Holanda, Bélgica y Luxemburgo)	Hombres y mujeres	Ningún tipo de fractura	C677T	Yazdanpanah, et. al., 2008

Japón	Mujeres	Ningún tipo de fractura	C677T / A1298C	Urano, et. al., 2009
Australia	Mujeres postmenopáusicas	Ningún tipo de fractura	C677T/ A1298C	Zhu, et. al. 2009
España	Mujeres postmenopáusicas	Ningún tipo de fractura	C677T	Agueda, et. al. 2010.

Recopilación de: Liang, et. al., 2014. \*Ningun tipo de fractura, es decir, no hay asociación de la presencia del polimorfismo con fracturas.

Diversos estudios han evidenciado que la tHcy crónica influye en la aparición de enfermedades cardiovasculares, cognitivas y crónico-degenerativas como osteoporosis (Bozkurt, y otros, 2009; Bucciarelli et. al., 2010; Gjesdal et. al., 2006; Golbahar, Aminzadeh, Hamidi, & Omrani, 2005; Morris et. al., 2005),

En nuestro estudio no se encontró asociación significativa del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* y los polimorfismos A1298C y C677T del gen *MTHFR* con la DMO en el grupo de mujeres postmenopáusicas.

Para saber las posibles causas de este resultado, es importante conocer que la Hcy modula la producción del colágeno mediante una serie de mecanismos en los que intervienen las células óseas. El incremento de los osteoclastos disminuye la actividad de los osteoblastos. La Hcy afecta directamente la MEC reduciendo la fuerza del hueso (Vacek, Kalani, Voor, Tyagi, & Tyagi, 2012).

Los niveles de Hcy en sangre se relacionan con riesgo a fractura. La Hcy en concentraciones elevadas, interfiere con la acción de la enzima lisil oxidasa (LOX) afectando la síntesis de colágeno (Blouin et al., 2009), específicamente en el entrecruzamiento covalente de las unidades moleculares de elastina y colágeno (Liu, Nellaiappan & Kagan, 1997). El colágeno es una proteína estructural, que en los mamíferos abarca el 30% de las proteínas totales del organismo. Sus funciones principales son de mecánica y soporte; es un componente importante de la MEC (Bernales, Caride, Lewis, & Martin, 2004).

Los componentes extracelulares de la matriz ósea son orgánicos e inorgánicos. Las propiedades biomecánicas del hueso dependen de la composición y estructura de la matriz ósea (Romero, Manrique & Rodríguez, 2012). La matriz orgánica está formada por fibras de colágeno y representa el 90% de las proteínas del hueso. Las proteínas no colágenas son proteoglicanos que contribuyen a la organización de la matriz ósea y modulación de diferenciación de los osteoblastos; también las proteínas matricelulares que participan en el desarrollo del esqueleto y reparación de fracturas, entre otras proteínas (Romero, Manrique & Rodríguez, 2012).

Los componentes inorgánicos forman del 50-70% del hueso, brindándole la característica de dureza. En mayor parte está formado por hidroxapatita (Romero, Manrique & Rodríguez, 2012). El calcio en forma de cristales de hidroxapatita, es el componente mineral más abundante del cuerpo y se encuentra en mayor proporción en los huesos, que les brinda dureza y gracias al colágeno elasticidad.

La evaluación de la DMO mediante el equipo DEXA, se enfoca en el estudio de los minerales y el hueso, no del colágeno, que es una proteína. Por lo que, aunque haya estudios que asocian la presencia de los polimorfismos C677T y A1298C con fracturas, no necesariamente tiene que ser un valor bajo de DMO.

La presencia de polimorfismos que alteren la composición del colágeno, afectan la calidad del tejido y por lo tanto la resistencia ósea que conlleva riesgo de fracturas (Pérez López, Cano, Calaf, Vázquez, & Ferrer Barriendos, 2009).

Este trabajo presenta algunas limitaciones que se describen a continuación. En primer lugar, el tamaño de la muestra es pequeño y tal vez esto influye en la falta de asociación encontrada, se sugiere continuar con el estudio para incrementar el número de mujeres participantes y tener más poder estadístico y confiabilidad en los resultados. En segundo lugar, cabe señalar que los bajos valores de DMO

se asocian con tHcy y ésta no fue una variable considerada en este trabajo, se sugiere hacer las mediciones correspondientes.

Esta investigación forma parte de un proyecto institucional que pretende identificar marcadores genéticos asociados a densidad mineral ósea en mujeres de esta región. Anteriormente se han analizado los genes *VDR*, *ESR1*, *JAG1*, *MEF2C* y *BDNF*, entre otros. Para ampliar el mapa genético de la OP, en este trabajo se analizaron polimorfismos de genes *MTHFR* y *CBS* que se pudieran asociar con dicha enfermedad y no se logró demostrar alguna asociación estadística, lo que sugiere que hay otros factores (genéticos y/o ambientales)., como la afección del colágeno por la tHcy elevada, que puede conducir al daño de la matriz orgánica del hueso y por lo tanto afectar en su calidad y elasticidad, lo conduce a fracturas osteoporóticas, independientemente de la DMO del hueso.

## 10. CONCLUSIONES

Dados los resultados anteriormente presentados, se establecen las siguientes conclusiones:

Los valores de la densidad mineral ósea en el grupo de estudio son semejantes a los reportados previamente para la región.

Este es el primer reporte sobre las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* mujeres postmenopáusicas de la región.

Este parece ser el primer reporte a nivel nacional e internacional que analiza la relación del polimorfismo 844ins68 del gen *CBS* con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos A1298C y C677T del gen que codifica para la enzima MTHFR son semejantes a los reportados en población de Nuevo León, mexicanos nacidos en los Ángeles, americanos mexicanos, mexicanos del occidente de México no así en el caso de población danesa y brasileña para el polimorfismo C677T.

Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 844ins68 fueron semejantes para la población Italiana y de Guadalajara y su área metropolitana.

No se encontró asociación de los polimorfismos 844ins68 del gen de la *CBS* y A1298C, C677T del gen de la MTHFR con la densidad mineral ósea, solamente se observó una tendencia en la densidad mineral ósea en columna L2-L4 ajustada al IMC y edad en el modelo de herencia genético recesivo.

Por lo tanto estos polimorfismos no se pueden emplear como marcadores genéticos de la densidad mineral ósea, para mujeres postmenopáusicas de Monterrey y su área metropolitana.

Esta investigación puede ser de utilidad para futuros estudios en los que se analice la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas, así como complementaria para casos en los que se analice el metabolismo de la homocisteína como marcador de la densidad mineral ósea, así también, para estudios que involucren la influencia de las vitaminas del complejo B en la densidad mineral ósea.



## 11. REFERENCIAS

- Abrahamsen, B., Madsen, J.S., Tofteng, C.L., Stilgren, L., Bladbjerg, E.M., Kristensen, S.R, ...Mosekilde, L. (2003). A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *Jorunal of Bone and Mineral Research*, 18(4), 723-729.
- Agueda, L., Urreizti, R., Bustamante. M., Jurado, S., García-Giralt, N., Díez-Pérez, A., ... Balcells, S. (2010). Analysis of three functional polymorphisms in relation to osteoporosis phenotypes: replication in a Spanish cohort. *Calcified Tissue International*, 87(1), 14-24.
- Aguirre-Rodríguez, A. A., Martínez-de-Villarreal, L. E., Velázquez-Campos, M., Sampallo-Hernández, E. (2008). Prevalencia del polimorfismo 677T del gen MTHFR en una muestra de la población de Nuevo León, México. *Salud Pública de México*. 50 (1), 5,7.
- Akar, N., Akar, E., Deda, G. & Saadet, A. (2000). Spina bífida and common mutations at the homocysteine metabolism pathway. *Clinical Genetics*, 57 (3), 230-231. doi: 10.1034/j.1399-0004.2000.570310.x.
- Aléssio, A.C., Siqueira, L.G., Bydlowski, S.P., Höehr, N.F. & Bizzacchi, J.M. (2008). Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. *American Journal of Medical Genetics. Part A*. 146A (20), 2598 – 5602. doi: 10.1002/ajmg.a.32496.
- Antonio-Véjar V., Del Moral-Hernández O., Alarcón-Romero L. C., Flores-Alfaro E., Leyva-Vázquez M. A., Hernández-Sotelo D. & Illades-Aguir B. (2014). Ethnic variation of the C677T and A1298C polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate-reductase (MTHFR) gene in southwestern Mexico. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3), 7950-7959. doi: 10.4238/2014.

Appelman-Dijkstra N.M. & Papapoulos S.E. (2014). Novel approaches to the treatment of osteoporosis. *Best practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28 (6), 843 – 857. doi:10.1016/j.beem.2014.07.003.

Applied Biosystems®. (2010). TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol. Life Technologies. Recuperado el 14 de enero de 2016: [http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/Documents/PDFs/TaqMan\\_SP\\_Genotyping\\_Assays.pdf](http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/Documents/PDFs/TaqMan_SP_Genotyping_Assays.pdf)

Applied Biosystems®. (2015). SNP Genotyping Analysis Using TaqMan® Assays. Recuperado el 14 de enero de 2016 de: <http://www.lifetechnologies.com/mx/es/home/life-science/pcr/real-timepcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>

Aranguren-Méndez J.A., Román-Bravo R., Isea W., Villasmil Y. & Jordana J. (2005). Los microsatélites (STR's) marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 2005; 13(1), 30-42.

Audiffred-Jaramillo, R. I., García-Cobián, T. A., García-de-Alba-García, J. E. & Rubio-Arellano, E. D. (2016). Asociación del polimorfismo MTHFR C677T con la predominancia sintomatológica en una muestra de pacientes con esquizofrenia de Jalisco, México. *Acta Universitaria*, 26(1), 56-64. doi: 10.15174/au.2016.838.

Baines, M., Kredan, M.B., Usher, J., Davison, A., Higgins, G., ... Ranganath L.R. (2007). The association of homocysteine and its determinants MTHFR genotype, folate, vitamin B12 and vitamin B6 with bone mineral density in postmenopausal British women. *Bone*, 40 (3), 730 – 736. doi:10.1016/j.bone.2006.10.008.

Baptista-González, H. (2009). Coexistencia de las mutaciones C677T y A1298C en el gen MTHFR y eventos trombóticos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 66 (6), 582 – 585.

Barba-Evía, J. R. (2011). Marcadores de remodelado óseo y osteoporosis. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 58 (3), 113 – 137.

Baron, R. & Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, 19(2), 179 – 192. doi: 10.1038/nm.3074

Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 94 (1), 25 – 34.

Bernales, D. M., Caride, F., Lewis, A. & Matin L. (2004). Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 23(2), 65-74.

Bathum, L., Bornemann Hjelmberg, J., Christiansen, L., Madsen, J.S., Skytthe, A. & Christensen, K. (2004). Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporosis International*, 15(8), 659-664.

Bertoia, M. L., Pai, J. K., Cooke, J. P., Joosten, M.M., Mittleman, M. A., Rimm, E. B., ... Mukamal, K. J. (2014). Plasma homocysteine, dietary B vitamins, betaine, and choline and risk of peripheral artery disease. *Atherosclerosis*, 235 (1). 94 – 101. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.010.

Blouin S., Thaler H.W., Korninger C., Schmid R., Hofstaetter J.G., Zoehrer R., Phipps R., Klaushofer K., Roschger P., Paschalis E.P. (2009). Bone matrix quality and plasma homocysteine levels. *Bone*, 44(5), 959-964. doi:10.1016/j.bone.2008.12.023.

Botto, L. D. & Yang, Q. (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 151 (9), 862 – 877.

Bozkurt, N., Erdem, M., Yilmaz, E., Erdem, A., Biri, A., Kubatova, A.,...Bozkurt, M. (2009). The relationship of homocysteine, B12 and folic acid with the bone mineral density of the femur and lumbar spine in Turkish postmenopausal women. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 280 (3), 381 – 387. doi:10.1007/s00404-009-0936-0.

Brambila-Tapia, A.J., Durán-González, J., Sandoval-Ramírez, L., Mena, J. P., Salazar-Páramo, M., Gámez-Nava, J. I.,... Dávalos IP. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Disease Markers*, 32 (2), 109 – 114. doi: 10.3233/DMA-2011-0868.

Brincat, M., Gambin, J., Brincat, M. & Calleja-Agius, J. (2015). The role of vitamin D in osteoporosis. *Maturitas*, 80(3), 329 – 332. doi:10.1016/j.maturitas.2014.12.018.

Bruyère, O.1 & Reginster J. Y. (2014). Monitoring of osteoporosis therapy. Best Practice & Research. *Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28 (6), 835 – 841. doi:10.1016/j.beem.2014.07.001.

Bucciarelli, P., Martini, G., Martinelli, I., Ceccarelli, E., Gennari, L., Bader, R. ... Mannucci, P. M. (2010). The relationship between plasma homocysteine levels and bone mineral density in post-menopausal women. *European Journal of Internal Medicine*, 21 (4), 301 – 305. doi: 10.1016/j.ejim.2010.03.017.

Cagnacci, A., Baldassari, F., Rivolta, G., Arangino, S., & Volpe, A. (2003). Relation of homocysteine, folate, and vitamin B12 to bone mineral density of postmenopausal women. *Bone*, 33(6), 956 – 959.

Cheng XY, Cao CF, Ji B et al (2009) Association between MTHFR C677T polymorphism and osteoporotic fractures risk. *Chin J Gerontol* 29:2441–2443

Cheng, C. H., Huang, Y. C., Chen, F. P., Chou, M. C. & Tsai, T. P. (2008). B-vitamins, homocysteine and gene polymorphism in adults with fasting or post-

methionine loading hyperhomocysteinemia. *European Journal of Nutrition*, 47(8), 491-498. doi:10.1007/s00394-008-0752-5.

Clark, P., Carlos, F. & Vázquez-Martínez, J. L. (2010). Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in Mexico. *Archives of Osteoporosis*, 5(1), 9 – 17. doi:10.1007/s11657-010-0042-8.

Clarke, M., Ward, M., Strain, J. J., Hoey, L., Dickey, W. & McNulty, H. (2014). B-vitamins and bone in health and disease: the current evidence. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 73(2), 330-339. doi: 10.1017/S0029665114000044.

Court, M. H. (2005-2008). Tufts University Comparative and Molecular Pharmacogenomics Laboratory. A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>

Contreras-Cubas, C., Sánchez-Hernández, B. E., García-Ortiz, H., Martínez-Hernández, A., Barajas-Olmos, F., Cid, M.,... Orozco, L. (2016). Heterogeneous distribution of MTHFR gene variants among mestizos and diverse amerindian groups from Mexico. *Plos One*, 11(9), 1-13. doi:10.1371/journal.pone.0163248.

Danckworth, F., Karabul, N., Posa, A. & Hanisch, F. (2014). Risk factors for osteoporosis, falls and fractures in hereditary myopathies and sporadic inclusion body myositis — A cross sectional survey. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 1, 85-97. doi: dx.doi.org/10.1016/j.ymgmr.2013.12.005.

Dávalos, I. P., Olivares, N., Castillo, M. T., Cantú, J. M., Ibarra, B., Sandoval, L., ... Rivas, F. (2000). The C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in Mexican mestizo neural-tube defect parents, control mestizo and native populations. *Annales de Génétique*, 43(2), 89 – 92. doi: dx.doi.org/10.1016/S0003-3995(00)90012-1.

Dekou, V., Gudnason, V., Hawe, E., Miller, G.J., Stansbie, D. & Humphries S.E. (2001). Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. *Thrombosis Haemostasis*, 85(1), 67-74.

Delezé, M., Cons-Molina, F., Villa, A. R., Morales-Torres, J., González-González, J. G., Calva, J. J.,... Elizondo, J. (2000). Geographic differences in bone mineral density of Mexican women. *Osteoporosis International*, 11(7), 562 – 569.

Delgado-Enciso, I., Martínez-Garza, S. G., Rojas-Martínez, A., Espinoza-Gómez, F., Canseco-Avila, L.M., Vidal-Gutiérrez, O., ... Ortiz-López, R. (2006). Interacciones entre polimorfismos del gen MTHFR, gestaciones e inicio de vida sexual modifican el riesgo para cáncer cérvico-uterino en una población del noreste de México. *Revista de Investigación Clínica*, 58(5), 462 – 469.

Díaz-Socorro, C., Navarro-Despaigne, D., Santana-Pérez, F., Domínguez-Alonso, E. & Bacallao-Gallestey, J. (2012). Factores de riesgo modificables o no, relacionados con la densidad mineral ósea en mujeres de edad mediana. *Revista Cubana de Endocrinología*, 23(1), 44 – 55.

Di-Renzo, L., Marsella, L. T., Sarlo, F., Soldati, L., Gratteri, S., Abenavoli, L., ... De Lorenzo, A. (2014). C677T gene polymorphism of MTHFR and metabolic syndrome: response to dietary intervention. *Journal of Translational Medicine*, 12 (329), 1 – 9. doi: 10.1186/s12967-014-0329-4.

Dutta, S., Sinha, S., Chattopadhyay, A., Gangopadhyay, P. K., Mukhopadhyay, J., Singh, M., ... Mukhopadhyay, K. (2005). Cystathionine beta-synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. *Behavioral and Brain Functions*, 1(25), 1 – 6. doi:10.1186/1744-9081-1-25.

Ensembl. (2016, marzo). Population genetics. Recuperado de <http://www.ensembl.org/index.html>

Esfahani, S. T., Cogger, E. A. & Caudill, M. A. (2003). Heterogeneity in the prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in women of different ethnic groups. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(2), 200 – 207.

Falcón Ramírez, E. (2009). Polimorfismos en el gen LRP5 y su relación con la densidad mineral ósea en mujeres mexicanas. México, DF.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarrón, M., Blanco-Jerez, L. (2006) Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. *Medicina Oral*, 11, 151 – 157.

Franchis, R., Fermo, I., Mazzola, G., Sebastio, G., Minno, G., Coppola, A., Andria, G. & Angelo, A. (2000). Contribution of the cystathionine beta-synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thrombosis Haemostasis*, 84(4), 576-582.

Franco, R., Maffei, F., Lourenço, D., Piccinato, C., Morelli, V., Thomazini, I., ... Zago, M. (1998). The frequency of 844ins68 mutation in the cystathionine beta-synthase gene is not increased in patients with venous thrombosis. *Haematologica*, 83(11), 1006 – 1008.

Gallagher, J. C. & Sai, A. J. (2010). Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*, 65(4), 301-307. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.01.002.

Gallegos-Arreola, M. P., Figuera-Villanueva, L. E., Ramos-Silva, A., Salas-González, E., Puebla-Pérez, A. M., Peralta-Leal, V., ... Zúñiga-González, G. M. (2014). The association between the 844ins68 polymorphism in the CBS gene and breast cancer. *Archives of Medical Science*, 10(6), 1214-1224. doi: 10.5114/aoms.2014.47830.

GE Healthcare. (2010, Enero). Lunar enCORE-based X-ray Bone Densitometer User Manual. Retrieved from [http://medicaloutfitter.net/wp-content/uploads/2014/09/enCORE\\_V13.5\\_EN\\_English.pdf](http://medicaloutfitter.net/wp-content/uploads/2014/09/enCORE_V13.5_EN_English.pdf)

Gennari, L., Becherini, L., Falchetti, A., Masi, L., Massart, F. & Brandi, M. L. (2002). Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81(1), 1-24.

Gerdhem, P., Ivaska, K. J., Isaksson, A., Pettersson, K., Vaananen, H. K., Obrant, K. J., ... Akesson, K. (2007). Associations between homocysteine, bone turnover, BMD, Mortality, and fracture risk in elderly women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22 (1), 127 – 131.

Gjesdal, C. G., Vollset, S. E., Ueland, P. M., Refsum, H., Drevon, C. A., Gjessing H. K., ... Tell, G. S. (2006). Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Archives of Internal Medicine*, 166(1), 88-94.

Golbahar, J., Aminzadeh, M. A., Hamidi, S. A. & Omrani, G. R. (2005). Association of red blood cell 5-methyltetrahydrofolic acid with bone mineral density in postmenopausal Iranian women. *Osteoporosis International*, 16(12), 1894, 1898. doi:10.1007/s00198-005-1961-x.

Golimbet, V., Korovaitseva, G., Abramova, L. & Kaleda, V. (2009). The 844ins68 polymorphism of the cystathionine beta-synthase gene is associated with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 170(2-3), 168 – 171. doi: 10.1016/j.psychres.2008.07.007.

González-Herrera, L., García-Escalante, G., Castillo-Zapata, I., Canto-Herrera, J., Ceballos-Quintal, J., Pinto-Escalante, D., ... Orozco-Orozco L. (2002). Frequency of the thermolabile variant C677T in the MTHFR gene and lack of association with neural tube defects in the State of Yucatan, Mexico. *Clinical Genetics*, 62(5), 394 – 398. doi:10.1034/j.1399-0004.2002.620507.x.

González-Mercado, M. G., Rivas, F., Salazar-Páramo, M., Gallegos-Arreola, M. P., Morán- Moguel, M. C., Moreno, A., ...Dávalos-Rodríguez, I. P. (2014). Homocisteína, polimorfismos MTHFR C677T, A1298C y variables clínico-



bioquímicas en población mexicana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(1), 23 – 31.

Guéant-Rodriguez, R. M., Guéant, J. L., Debard, R., Thirion, S., Hong, L. X., Bronowicki, J. P., ...Mutchinick, O. M.(2006). Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677T and 1298C alleles and folate status: a comparative study in Mexican, West African, and European populations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(3), 701 – 707.

Gutiérrez-Revilla, J. I., Pérez-Hernández, F., Calvo-Martín, M. T., Tamparillas-Salvador, M. & Gracia-Romero, J. (2003). Implicación de los polimorfismos C677T y A1298C del gen MTHFR en el desarrollo de los defectos del tubo neural en la población española. *Medicina Clínica*, 120(12), 441 – 445.

Hensye, G., Valente-Da-Silva, H. G., Mendoca, L., Flavia, L., Conceicao, F., Zahar, S. & Farías, M. (2007). Influence of Obesity on Bone Density in Postmenopausal Women. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 51(6), 943-949.

Hong, X., Hsu, Y. H., Terwedow, H., Tang, G., Liu, X., Jiang, S., ... Xua, X. (2007). Association of the Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and fracture risk in Chinese postmenopausal women. *Bone*, 40(3), 737-742.

Iniesta, R., Guinó, E. & Moreno V. (2005). Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2014). Esperanza de vida. Retrieved from Esperanza de vida: <http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/esperanza.aspx?tema=P>

International Osteoporosis Foundation [IOF]. (2007). Conozca y reduzca sus factores de riesgo de osteoporosis. Recuperado de [http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/PDFs/know\\_and\\_reduce\\_your\\_risk\\_spanish.pdf](http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/PDFs/know_and_reduce_your_risk_spanish.pdf)

International Osteoporosis Foundation [IOF]. (2015). The Latin American Regional Audit.Epidemiology, costs & burden of osteoporosis in 2012. Recuperado de <http://www.iofbonehealth.org/latin-america>

Jeon, Y. K., Lee, J. G., Kim, S. S., Kim, B. H., Kim, S. J., Kim, Y. K., ... Kim, I. J. (2011). Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Endocrine Journal*, 58(2), 87 – 93. doi: doi.org/10.1507/endocrj.K10E-297.

Jorgensen H.L., Madsen, J.S., Madsen, B., Saleh, M.M., Abrahamsen, B., Fenger, M. & Lauritzen, J.B. (2002). Association of a common allelic polymorphism (C677T) in the methylene tetrahydrofolate reductase gene with a reduced risk of osteoporotic fractures. A case control study in Danish postmenopausal women. *Calcified Tissue International*, 71(5), 386–392.

Kibee, W. (25 de Mayo de 2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Recuperado el enero de 2016, de <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

Klein-Nulend, J., Van-Oers, R.F., Bakker, A. D. & Bacabac R. G. (2015). Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis. *Journal of Biomechanics*, 48(5), 855 – 865. doi:dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2014.12.007.

Kondo, H., Fujino, H., Nagatomo, F. & Ishihara, A. (2014). Influence of estrogen receptor  $\alpha$  polymorphisms on bone density in response to habitual exercise in Japanese postmenopausal women. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-7. doi: dx.doi.org/10.1155/2014/593927

Leib, E. S., Lewiecki, E. M., Binkley, N. & Hamdy, R. C. (2004). Official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *Journal of Clinical Densitometry*, 7(1), 1 – 6.

Li, M., Lau, E. M. & Woo, J. (2004). Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism (MTHFR C677T) and bone mineral density in Chinese men and women. *Bone*, 35(6), 1369 – 1374. doi:10.1016/j.bone.2004.09.008.

Liang, T.J., Liu, H., Zhao, X.Q., Tan, Y.R., Jing, K. & Qin CY. (2014). Quantitative assessment of the association between MTHFR rs1801131 polymorphism and risk of liver cancer. *Tumor Biology*, 35(1), 339-343. doi: 10.1007/s13277-013-1046-y.

Liew, S. C. & Gupta, E. D. (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *European Journal of Medical Genetics*, 58(1), 1 – 10. doi: 10.1016/j.ejmg.2014.10.004.

Liu G., Nellaippan K., Kagan H.M. (1997). Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32370-32377.

Lorente-Ramos, R.M., Azpeitia-Armán, J., Arévalo-Galeano, N., Muñoz-Hernández, A., García-Gómez, J. M. & Gredilla-Molinero, J. (2012). Absorciometría con rayos X de doble energía. Fundamentos, metodología y aplicaciones clínicas. *Radiología*, 54(5), 410 - 423. doi: 10.1016/j.rx.2011.09.023

Martínez-de-Villarreal, L. E., Delgado-Enciso, I., Valdéz-Leal, R., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A., Limón-Benavides, C., ... Villarreal-Pérez, J. Z. (2001). Folate levels and N(85),N(10)-methylenetetrahydrofolate reductase genotype (MTHFR) in mothers of offspring with neural tube defects: a case-control study. *Archives of Medical Research*, 32(4), 277 – 282. doi: 10.1016/S0188-4409(01)00292-2.

Martínez-Morillo, M., Grados, D. & Holgado, S. (2012). Premenopausal Osteoporosis: How to Treat?. *Reumatología Clínica*, 8(2), 93 – 97.

McLean, R. R. & Hannan, M. T. (2007). B vitamins, homocysteine, and bone disease: epidemiology and pathophysiology. *Current Osteoporosis Reports*, 5 (3), 112-119. doi: 10.1007/s11914-007-0026-9.

- Meertens, L., Díaz, N., Fraile, C., Riera, M., Rodríguez, A., Rodríguez, L., ... Solano, L. (2011). Estado nutricional, indicadores antropométricos y homocisteína sérica en mujeres postmenopáusicas venezolanas. *Revista Chilena Nutricional*, 38(3), 278-284.
- Morris, M. S., Jacques, P. F. & Selhub, J. (2005). Relation between homocysteine and B-vitamin status indicators and bone mineral density in older Americans. *Bone*, 37(2), 234-242. doi: 10.1016/j.bone.2005.04.017
- Muñoz-Torres, M., Varsavsky M. & Avilés-Pérez, M. D. (2010). Osteoporosis. Definición. Epidemiología. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 2(3) 5-7.
- Murillo-Uribe, A., Aranda-Gallegos, J. E., Río-de-la-Loza-Cava, M. F., Ortiz-Luna, G., Mendoza-Torres, J. & Santos-González, J. (1998). Relación del índice de masa corporal con la densidad mineral ósea en una población de mujeres mexicanas. *Ginecología y Obstetricia de México*, 66(7), 267-270.
- Mutchinik, O. M., López, M. A., Luna, L., Waxman, J. & Babinsky, V. E. (1999). High prevalence of the thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase variant in Mexico: a country with a very high prevalence of neural tube defects. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(4), 461-467. doi:10.1006/mgme.1999.2939
- Nava-González, E. J., Gallegos-Cabriales, E., & Bastarrachea, R. A. (2013). Los fenotipos del metabolismo óseo y del tejido adiposo Revisión sistemática de su relación. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 52(6), 644-650.
- Nissen, N., Madsen, J. S., Bladbjerg, E. M., Beck-Jensen, J. E., Jorgensen, N. R., Langdahl, B., ... Brixen, K. (2009). No association between hip geometry and four common polymorphisms associated with fracture: the Danish osteoporosis prevention study. *Calcified Tissue International*, 84(4), 276-285. doi:10.1007/s00223-009-9219-9

Nitsche, F., Alliende M. A., Santos, J. L., Pérez, F., Santa-María, L., ... Cortes, F. (2003). Frequency of C677T polymorphism of 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) in Chilean mothers of spina bifida cases and controls. *Revista Médica de Chile*, 131, 1399-1404.

Ouzzif, Z., Oumghar, K., Sbai, K., Mounach, A., Derouiche, E. & El-Maghraoui, A. (2012). Relation of plasma total homocysteine, folate and vitamin B12 levels to bone mineral density in Moroccan healthy postmenopausal woman. *Rheumatology International*, 32(1), 123-128. doi: 10.1007/s00296-010-1551

Pepe, G., Camacho-Vanegas, O., Rickards, O., Giusti, B., Comeglio, P., Brunelli, T., Marcucci, R.,... Abbate, R. (1999). World distribution of the T833C/844ins68 CBS in cis double mutation: a reliable anthropological marker. *Human Genetics*, 104(2), 126-129.

Pérez-López, F. R., Cano Aranda, A., Calaf, J., Vázquez Valdés, F. & Ferrer Barriandos, J. (2009). Factores reguladores del recambio óseo: estrógenos y vitamina D. *Obstetricia y Ginecología*, 52(2), 99-108.

Raggatt, L. J. & Partridge, N. C. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The Journal Biological Chemistry*, 285(33), 103-108.

Ramkaran, P., Phulukdaree, A., Khan, S., Moodley, D. & Chuturgoon, A. A. (2015). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with increased risk of coronary artery disease in young South African Indian African Indians. *Gene*, 571(1), 28 - 32.

Refsum, H., Nurk, E., Smith, A. S., Gjesdal, C. G., Bjelland, I., Tverdal, A., ... Vollset, S. E. (2006). The Hordaland Homocysteine Study: A community-Based Study of Homocysteine, Its determinants, and associations with Disease. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1731-1740.

Reyes-Engel, A., Muñoz, E., Gaitan, M. J., Fabre, E., Gallo, M., Dieguez, J.L., ... Morell, M. (2002). Implications on human fertility of the 677C→T and 1298A→C polymorphisms of the MTHFR gene: consequences of a possible

genetic selection. *Molecular human reproduction*, 8(10), 952-957. doi:10.1093/molehr/8.10.952

Robien, K. & Ulrich, C. M. (2003). 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk: A Huge Minireview. *American Journal of Epidemiology*, 157(7), 571-582. doi:10.1093/aje/kwi188

Roblin, X., Phelip, J. M., Genevoius, M., Ducros, V. & Bonaz, B. (2007). Hyperhomocysteinemia is associated with osteoporosis in patients with Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 25(7), 797-804. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03260.x

Romero, C. M., Manrique, S. & Rodríguez, M. (2012). Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatología Clínica*, 8(2), 149-152.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular (5a ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

Rumbak, I., Zizic, V., Sokolie, L., Cvijetie, S., Kajfez, R. & Colie-Barie, I. (2012). Bone mineral density is not associated with homocysteine level, folate and vitamin B12 status. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(4), 991-1000. doi: 10.1007/s00404-011-2079-3

Saladin, K. S. (2013). Anatomía y Fisiología la unidad entre forma y función (6ª ed.). D.F., México: Mc-Graw Hill.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: a laboratory manual (3ª ed.). Nueva York, Estados Unidos de América: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Cuevas, M., Jiménez-Reséndiz, S. P. & Morgado-Vázquez, J. S. (2009). La homocisteína: un aminoácido neurotóxico. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(1), 3-8.

Sánchez, C., Planells, E., Aranda, P., Pérez-de-la-Cruz, A., Asencio, C., Mataix, J. & Llopis, J. (2007). Vitaminas B y homocisteína en la insuficiencia renal crónica. *Nutrición Hospitalaria*, 22(6), 661-671.

Ouyang, S., Liz, Z., Li, Y., Ma, F. & Wu, J. (2014). Cystathionine beta-synthase 844ins68 polymorphism is unrelated to susceptibility to neural tube defects. *Gene*, 535(2), 119-123. doi: 10.1016/j.gene.2013.11.052.

Schneider, J.A., Rees, D.C., Liu, Y.T. & Clegg JB. (1998). Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation. *American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1258-1260. DOI: 10.1086/301836.

Shiraki, M., Urano, T., Kuroda, T., Saito, M., Tanaka, S., Miyao-Koshizuka, M. & Inoue, S. (2008). The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *Journal Bone Mineral Metabolism*, 26(6), 595-602. doi:10.1007/s00774-008-0878-9

Soyupek, F., Cerci, S., Yildiz, S., Yildiz, M. & Gumus, B. (2007). Effect of Homocysteine on Bone Mineral Density of Rats. *Biological Trace Element Research*, 118(3), 255-259. doi: 10.1007/s12011-007-0034-8.

Strakova J. (2001). Role of betaine-homocysteine S-methyltransferase homocysteine methylation. (Tesis doctoral). Urbana Illinois.

Tamayo-de-Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013). Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70 – 78. doi.org/10.1157/13059826

Tolosa-de-Talamoni, N. (2007). Osteoporosis y polimorfismos del gen receptor de vitamina D. *Endocrinología y Nutrición*, 54(2), 96-101.

Tsai, M. Y., Bignell, M., Schwichtenberg, K. & Hanson, N. Q. (1996). High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *American Journal of Human Genetics*, 59(6), 1262-1267.

Health Care. (2013). Recuperado el julio de 2016, de <http://healthcare.utah.edu/healthlibrary/related/doc.php?type=85&id=P03232>

Urano, T. & Inoue, S. (2014). Genetics of osteoporosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(2), 287-293. doi:<http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.141>.

Urano, W., Furuya, T., Inoue, E., Taniguchi, A., Urano, T., Kotake, S.,... Yamanaka, H. (2009). Associations between methotrexate treatment and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with incident fractures in Japanese female rheumatoid arthritis patients. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 27(5), 574-583. doi: 10.1007/s00774-009-0073-7.

Valdés-Flores, M., Casas-Ávila, L., Falcón-Ramírez, E. & Ponce-de-León-Suárez, V. (2012). Aspectos genéticos de la osteoporosis. *Revista de Investigación Clínica*, 64(3), 294-307.

Vacek, T. P., Kalani, A., Voor, M. J., Tyagi, S. C., & Tyagi, N. (2012). The role of homocysteine in bone remodeling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(3), 123-128. doi: 10.1515/cclm-2012-0605.

Valero, C., Alonso, M.A., Zarrabeitia, M.T. Viadero, C., Hernández, J.L. & Riancho, J.A. (2007). MTHFR C677T polymorphism and osteoporotic fractures. *Hormone and Metabolic Research*, 39(8), 543-547.

Velázquez-Cruz, R., García-Ortiz, H., Castillejos-López, M., Quiterio, M., Valdés Flores, M., Orozco, L.,... Salmerón, J. (2014). WNT3A gene polymorphisms are associated with bonemineral density variation in postmenopausal mestizo women of an urban Mexican population: findings of a pathway-based high-density single nucleotide screening. *Age*, 36(3), 1483-1492. doi:10.1007/s11357-014-9635-2

Vilas-Boas, W., Olivera-Goncalves, R., Nunes-Costa, O. L. & Souza-Goncalves, M. (2015). Metabolism and gene polymorphisms of the folate pathway in Brazilian women with history of recurrent abortion. *Revista*



*Brasileira de Ginecología*, 37(2), 71-76. doi:10.1590/SO100-720320140005223.

Villadsen, M.M., Bunger, M.H., Carstens, M. Stenkjaer, L., & Langdahl, B.L. (2005) Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporosis International*, 16(4), 411-416.

Wang, X.L., Duarte, N., Cai, H., Adachi, T., Sim, A.S., Cranney, G. & Wilcken D.E. (1999). Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis*, 146(1), 133-140.

Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. & Rozen, R. (1998). A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular genetics and metabolism*, 64(3), 169-172. doi: 10.1006/mgme.1998.2714

Welsch, U. & Deller, T. (2010). Sobotta Histología (3ª ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

Yang-Huang, Q. & Chee-Kung, A. W. (2006). Genetics of osteoporosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88(4), 295-306. doi: 10.1016/j.ymgme.2006.04.009

Yang, Q.H., Botto, L. D., Gallagher, M., Friedman, J., Sanders, C., Koontz, D.,... Steinberg, K. (2008). Prevalence and effects of gene-gene and gene-nutrient interactions on serum folate and serum total homocysteine concentrations in the United States: findings from the third National Health and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 232-246. doi:88/1/232 .

Yazdanpanah, N., Uitterlinden, A.G., Zillikens, M.C. Jhamai, M., Rivadeneira, F., Hofman, A. , ... Van Meurs, J.B. (2008) Low dietary riboflavin but not folate

predicts increased fracture risk in postmenopausal women homozygous for the MTHFR 677 T allele. *Journal Bone Mineral Research*, 23(1), 86-94.

Zhang, H., Tao, X. & Wu, J. (2014). Association of homocysteine, vitamin B12, and folate with bone mineral density in postmenopausal women: a meta-analysis. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289, 1003-1009. doi: 10.1007/s00404-013-3075-6.

Zhu, K., Beilby, J., Dick, I.M., Devine, A., Soós, M. & Prince, R.L. (2009). The effects of homocysteine and MTHFR genotype on hip bone loss and fracture risk in elderly women. *Osteoporosis International*, 20(7), 1183-1191. doi: 10.1007/s00198-008-0804-y.

## 12. Anexos

### Anexo A



#### Carta de consentimiento informado



Monterrey, Nuevo León a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Por medio de la presente, yo  
\_\_\_\_\_ autorizo mi

participación en el proyecto de investigación titulado “Asociación del polimorfismo 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas”. El objetivo de este estudio es identificar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

- Completar la ficha de datos personales así como un registro de frecuencia alimentaria.
- Permitir la extracción de una muestra de 10ml de sangre.
- Evaluación de la densidad mineral ósea por medio la absorciometría de rayos X de doble energía (DEXA).

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

- Por la toma de muestra de sangre: malestar, dolor y formación de hematoma en el sitio del piquete de la vena.

- Por la evaluación de composición corporal, al ser un método simple, rápido y no invasivo no requiere preparación especial y se considera que no tiene efectos secundarios y sus riesgos son considerados mínimos.

Con lo anterior se generará información para determinar la asociación del polimorfismo 844ins68 del gen Cistationina  $\beta$ -sintasa (*CBS*) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen Metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas. Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica en cualquier momento que lo considere conveniente. El investigador principal, Lic. Nut. Angélica Deniss Escamilla Méndez con cédula profesional 8543624 (celular 8117424780) ha confirmado que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos, número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

---

Nombre y firma de la participante

---

Nombre y firma del investigador responsable

---

Testigo 1

---

Testigo 2

## Anexo B



**Proyecto:** Asociación de Asociación del polimorfismo 844ins68 del gen de la Cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) y de los polimorfismos A1298C y C677T del gen de la Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) con la densidad mineral ósea en mujeres postmenopáusicas.

---

---

### DATOS PERSONALES

Folio\_\_\_\_\_

Nombre\_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento \_\_\_\_\_ Lugar de nacimiento \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_ Estado civil \_\_\_\_\_

Fecha/edad de menarquia\_\_\_\_\_ Fecha/edad menopausia\_\_\_\_\_

Deporte y /o actividad física que practica \_\_\_\_\_

Ocupación \_\_\_\_\_ Horario \_\_\_\_\_

e-mail \_\_\_\_\_

Frecuencia

Fuma \_\_\_\_\_ Cantidad \_\_\_\_\_

Frecuencia

Alcohol \_\_\_\_\_ Cantidad \_\_\_\_\_

Suplementos \_\_\_\_\_ Nombre \_\_\_\_\_

### ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

---

---

Lugar de nacimiento \_\_\_\_\_

Padre \_\_\_\_\_

Abuelo paterno \_\_\_\_\_

Abuela paterna \_\_\_\_\_

Madre \_\_\_\_\_

Abuelo materno \_\_\_\_\_

Abuela materna \_\_\_\_\_

### Enfermedades en la familia

Si/No		Familiar
Hipertensión		
Infarto al miocardio		
Hipercolesterolemia		
Diabetes Mellitus		
Obesidad		
Cáncer		
Hipertrigliceridemia		
Osteoporosis		
Fracturas		
Hipertiroidismo		
Hiperparatiroidismo		
Síndrome de Cushing		
Insuficiencia renal crónica		
Enfermedad de Crohn		
Insuficiencia hepática		

Artritis reumatoide		
Malabsorción intestinal		
Otra (especificar)		

### ANTECEDENTES PATOLOGICOS PERSONALES

Alergias : \_\_\_\_\_ Especificar: \_\_\_\_\_ HTA \_\_\_\_\_  
 Hormonales \_\_\_\_\_  
 Intervenciones quirúrgicas \_\_\_\_\_ Enfermedad cardiovascular \_\_\_\_\_  
 Estreñimiento \_\_\_\_\_  
 Diarrea \_\_\_\_\_ Gastritis \_\_\_\_\_ Colitis \_\_\_\_\_  
 Hijos \_\_\_\_\_ Partos \_\_\_\_\_ Cesárea \_\_\_\_\_ Abortos \_\_\_\_\_  
 Padecimiento actual \_\_\_\_\_  
 Presión arterial \_\_\_\_\_ Pulsaciones por minuto \_\_\_\_\_

### MEDICAMENTOS

¿Qué medicamentos ha tomado últimamente? (últimos 6 meses)

Medicamento	Si/ No	Tipo
Ácido acetilsalicílico		
Acetaminofén		
Antiinflamatorios		
Diuréticos		
Clortalidona		
Espironolactona		
Beta bloqueadores		
Bloqueadores de calcio		

Nitratos		
Digoxina		
Anti arrítmicos		
Ranitidina		
Anti colesterolémicos		
Fibra natural (psillium)		
Hipoglucemiantes		
Hormonas		
Ansiolíticos		
Metformin		
Corticoides		
Sales de litio		
Anticonvulsionantes		